

« Eco-épidémiologie des communautés de chiroptères en France métropolitaine »



Responsable du projet :

Dominique Pontier
Professeur Lyon 1
Co-Directeur du LabEx ECOFECT
Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive
UMR-CNRS 5558
Université C. Bernard Lyon 1
43 Bd du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex
Tel. 04 72 43 13 37
dominique.pontier@univ-lyon1.fr

Responsable échantillonnage :

Jean-Baptiste Pons
Ingénieur d'étude – LabEx ECOFECT
Station de terrain de Barrouil
26 Bis Barrouil
33720 Illats
Tel. 06 78 65 40 01
jean-baptiste.pons@universite-lyon.fr

Sommaire

« Eco-épidémiologie des communautés de chiroptères.....	1
en France métropolitaine »	1
Sommaire	2
Présentation des grands axes du projet.....	3
Présentation du LabEx – ECOFECT	4
« Dynamiques Eco-évolutives des Maladie Infectieuses »	4
Première partie : Présentation du projet.....	5
Contexte	5
L'éco-épidémiologie des communautés.....	6
Les chiroptères, un excellent modèle d'étude.....	6
Chiroptères et éco-épidémiologie des communautés	12
Deuxième partie : Mise en œuvre du projet	15
Echelle géographique.....	15
Ethique	15
Les communautés d'espèces.....	16
Prélèvements biologiques et importance du cycle de vie des chiroptères.....	18
Stratégie d'échantillonnage.....	20
Différents types d'échantillonnage	21
Méthodes de capture.....	22
Protocoles d'échantillonnages	24
Annexe 1 : Liste des espèces de chiroptères en France métropolitaine.....	35
Annexe 2 : Charte de déontologie pour la pratique de la capture des chiroptères.....	36
Annexe 3 : Listing des métadonnées.....	38
Annexe 4 : Référentiel pour la saisie des données.....	39
Annexe 5 : Tableau des mesures biométriques.....	40
Annexe 6 : CLASSIFICATION DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES SELON LEUR DEGRÉ DE GRAVITÉ....	41
Annexe 7 : Modèle conceptuel du cycle de mue chez les chiroptères de zones tempérées	43
Annexe 8 : Exemples de progressions de mues.....	44
Bibliographie	45

Présentation des grands axes du projet

Le but de ce projet à long-terme d'approfondir nos connaissances sur la biologie et l'écologie des communautés de chiroptères vivant en France métropolitaine afin d'étudier leurs viromes et les mécanismes de leur coévolution. Les objectifs sont i) de définir les structurations génétiques des populations et des communautés, ii) d'identifier les agents infectieux présents dans les communautés et leurs possibles vecteurs, iii) de comprendre les patrons de dispersion et de circulation intra- et interspécifique des agents infectieux et leur impacts sur les communautés espèces, iv) d'évaluer les interactions entre les virus, leurs degrés de spécialisation et les pressions de sélection qui s'exercent sur cette communauté virale, v) de caractériser et d'étudier les pressions évolutives qui s'exercent sur le système hôtes-parasites chez les chiroptères.



Présentation du LabEx – ECOFECT

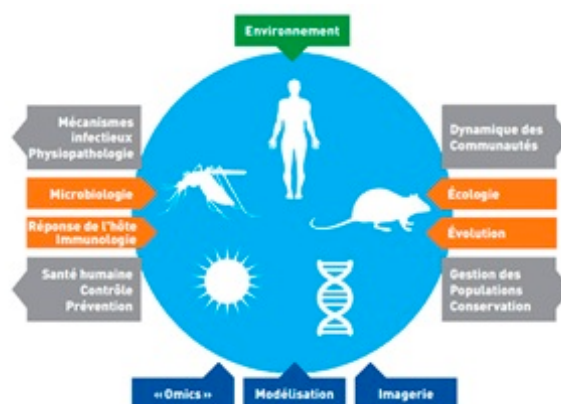
« Dynamiques Eco-évolutives des Maladie Infectieuses »

Les maladies infectieuses restent encore aujourd’hui une cause majeure de mortalité dans le monde, une menace pour les sociétés humaines, pour les animaux domestiques, mais également pour la gestion et la conservation de la faune sauvage. Les changements globaux, notamment la fragmentation des habitats, la translocation d’animaux, les changements climatiques et l’urbanisation croissante, introduisent une importante incertitude sur l’impact futur de ces maladies.

ECOFECT a pour objectif d'approfondir les connaissances sur les maladies infectieuses circulant dans les populations humaines et animales. Comprendre leurs dynamiques, leurs rôles dans l'évolution des organismes, des populations et des communautés, permettra de mieux prévenir, soigner et préserver.

ECOFECT est un consortium pluridisciplinaire (biologie, écologie, virologie, épidémiologie, immunologie, génomique des populations, mathématique, bio-informatique) regroupant 150 chercheurs et enseignants-chercheurs appartenant à **11 institutions scientifiques** (Université C. Bernard Lyon 1, ENS Lyon, CNRS, Inra, Insa), **médicales** (Inserm, Institut Pasteur, Hospices Civils de Lyon, Fondation Mérieux), **vétérinaire** (VetAgro sup) et **agronomique** (Inra).

ECOFECT s’appuie sur les outils modernes de la génétique, de la virologie moléculaire, de la microbiologie, sur des méthodologies et technologies de haut niveau en modélisation, bio-informatique, sur les nouveaux outils high-tech de suivis des populations animales (biologging) et sur la collaboration entre expérimentation et études sur le terrain.



Première partie : Présentation du projet

Contexte

Aujourd'hui les chiroptères comptent plus d'un millier d'espèces, ce qui représente près de 20% de la richesse spécifique des mammifères (Teeling EC, 2005). Il s'agit donc du deuxième ordre le plus important après celui des rongeurs. En Europe on dénombre 36 espèces de chiroptères, dont 34 sont présents en France métropolitaine et en Corse (MEDDE, 2012).

Les chiroptères forment un groupe taxonomique très ancien. Les premiers fossiles connus datent de l'Éocène et sont vieux de 50 millions d'années. Cette longue évolution les a dotés de caractéristiques biologiques et écologiques particulières qui font des chiroptères un ordre très original au sein des mammifères. Ce sont, en outre, les seuls mammifères terrestres à avoir développé le système d'écholocation pour se déplacer dans l'obscurité. Elles se déplacent en pratiquant le vol battu, leur permettant ainsi de parcourir de grandes distances. Elles ont conquis une grande diversité d'habitats et une multiplicité de niches écologiques. La majorité des chauves-souris sont insectivores comme en Europe, alors que sous les tropiques, on trouvera également des carnivores, des hématophages, des frugivores ou encore des nectarivores, etc. Les chauves-souris sont des espèces longévives et peuvent vivre 10 fois plus longtemps qu'un rongeur de même taille. D'une grande sociabilité, leurs stratégies d'accouplement et de reproduction diffèrent selon les espèces. Certaines se regroupent à l'automne sur des sites de « Swarming » afin de s'accoupler, comme la plupart des murins, alors que chez d'autres comme la Grande noctule (*Nyctalus lasiopterus*), le mâle choisit un gîte et appelle les femelles sur des placettes de chant ou à l'entrée de gîtes, entraînant ainsi des fécondations multiples. La diapause est observée chez la plupart des espèces de chauves-souris européennes, alors que chez le Minioptère de Schreibers (*Miniopterus Schreibersii*) par exemple, la fécondation de l'ovule a lieu immédiatement après l'accouplement et le développement de l'embryon est différé jusqu'au printemps (Dietz, 2009).

L'immense diversité de ces caractéristiques biologiques et écologiques, la grande ancienneté de ce taxon, la longue histoire commune de ce système hôtes-parasites, font des chiroptères, des hôtes privilégiés pour un grand nombre d'agent infectieux (Calisher CH, 2006; Wong S, 2007; Wong et al., 2011). Les chiroptères leur offrent un nombre incalculable de niches écologiques, de moyens de dispersion et d'évolution.

En virologie, les chauves-souris font l'objet d'une attention grandissante. Outre la transmission de certaines pathologies comme la rage, la découverte de nouveaux virus chez différentes espèces suggère qu'elles peuvent représenter une menace zoonotique pour l'homme (Leroy EM, 2005; Li W, 2005; Simons, Gale, Horigan, Snary, & Breed, 2014). De plus, ces dernières années, d'importantes épizooties

ont également porté grandement atteinte aux espèces elles-mêmes. En Amérique du Nord, le « Syndrome du nez Blanc » fait des ravages depuis 2006 et on estime à plus de 5 millions le nombre de chauves-souris tuées (Blehert, 2012). En Europe, en 2002, une très forte mortalité a affecté les populations de Minioptère de Schreibers (*Miniopterus Schreibersii*), notamment au Portugal, en Espagne et en France où on estime une chute des populations à plus de 40% (Roué S.Y., 2002). De plus, en 2011, à partir des cadavres collectés lors de cette vague de mortalité, une équipe espagnole découvre un nouveau Filovirus considéré comme pouvant être la cause de cette épizootie (Negredo et al., 2011).

Aujourd'hui, malgré ces constats et ces interrogations, très peu d'études tentent d'approfondir le sujet (Wibbelt et al., 2010). Il est certes important de continuer à rechercher et à caractériser les agents infectieux pouvant être hébergés par les chauves-souris, mais il est d'autant plus important d'étudier leur épidémiologie ; de comprendre comment ces agents circulent, affectent et persistent dans les communautés animales, afin identifier les mécanismes écologiques et évolutifs responsables. **Comprendre l'impact potentiel des agents infectieux sur les communautés de chiroptères représente un enjeu majeur pour la conservation de ces espèces menacées.**

L'éco-épidémiologie des communautés

L'éco-épidémiologie est encore considérée comme une science émergente, elle est multidisciplinaire, s'appuie sur l'écologie, la biologie, la virologie ou encore l'immunologie... Dans ses recherches sur le fonctionnement des maladies infectieuses, cette discipline vise à introduire la dimension écologique et comportementale dans la compréhension du système « hôtes – parasites » et de son évolution. Cette science vise notamment à répondre à des questions telles que : la modification d'un écosystème, la destruction d'habitats et l'érosion continue de la diversité biologique observée à l'échelle de la planète, a-t-elle des incidences sur la propagation des agents infectieux, sur leurs transferts d'une espèce ou d'un groupe d'espèces que l'on pourrait qualifier « d'hôtes historiques », vers de « nouveaux hôtes », vers d'autres espèces animales sauvages ou domestiques, ou encore vers l'homme ?

Les chiroptères, un excellent modèle d'étude

Afin de mener à bien un projet de recherche, le choix du modèle d'étude est indiscutablement primordial. Parmi l'ensemble des caractéristiques biologiques et écologiques des chiroptères présentées précédemment, certaines sont particulièrement intéressantes en éco-épidémiologie des communautés. Outre leur longue histoire évolutive et leur grande longévité, les chauves-souris sont sociables, peuvent

vivre en colonie, utilisent un réseau de gîtes, se déplacent et interagissent de façon intra ou interspécifique. Mais comme tous les mammifères, les chauves-souris sont les hôtes de nombreux agents infectieux, et doivent s'adapter continuellement à la pression de sélection qu'exerce un environnement en perpétuelle évolution.

1- Comportement social et interactions

Leur grande sociabilité varie en fonction des espèces, de leur cycle de vie ou de leur sexe. Elles peuvent former des petits groupes de quelques individus plus ou moins éparés, à des colonies extrêmement denses de plusieurs centaines de milliers d'individus. En Europe centrale, par exemple, les femelles de Grand Rhinolophe (*Rhinolophus ferrumequinum*) se rassemblent par milliers pour la mise-bas et l'élevage des jeunes (Dietz, 2009) ou encore, dans le sud-est des Etats-Unis, le Molosse du Brésil (*Tadarida brasiliensis*) est connu pour former des colonies de plus d'un million d'individus (Betke et al., 2008). Les mâles de nombreuses espèces ont tendance à passer la journée, seuls ou en groupe, durant la période d'élevage de jeunes, ils ne deviennent territoriaux qu'en période de rut.

Ces colonies peuvent être mono- ou plurispécifiques et il n'est pas rare de retrouver plus d'une dizaine d'espèces réparties dans divers secteurs d'une cavité en fonction des micro-habitats (Altringham, 2011). Selon les espèces et la période, différents types d'associations interspécifiques sont possibles. En France, durant la période de mise-bas, on peut aisément retrouver des Grands/Petits murins (*M. myotis*/*M. blythii*) avec des Minioptères de Schreibers (*Miniopterus schreibersii*). A une autre période de leur cycle biologique, lors de la période hivernale par exemple, ces derniers peuvent être accompagnés dans les sites d'hibernation par des Grands rhinolophes (*Rhinolophus ferrumequinum*), des Murins à oreilles échancrées (*Myotis emarginatus*) ou encore des Murins de Natterer (*Myotis nattereri*).

Une telle vie communautaire intra- et interspécifique, ne peut se faire sans organisation sociale ; la structure et la fréquence des contacts, qu'ils soient sociaux et/ou agressifs (léchage, toilettage, morsures, etc.) peuvent grandement différer entre les espèces et leur système d'appariement (Charles-Dominique P., 2001). Cette promiscuité et l'ensemble des contacts inhérents au gréganisme peuvent favoriser la transmission et la propagation d'agents infectieux entre les individus et au sein de la communauté.

2- Les gîtes

Les chauves-souris passent la plupart de leur cycle de vie dans leurs gîtes, le choix de ces derniers à une influence capitale sur leur écologie : distribution et densité populationnelle, stratégie d'alimentation et de reproduction, structure sociale, déplacement de populations, etc. Le changement de gîte est fréquent chez la plupart des chiroptères, notamment chez les espèces forestières comme le Murin de

Bechstein (*Myotis bechsteinii*), la Barbastelle d'Europe (*Barbastella barbastellus*) ou encore la Grande noctule (*Nyctalus lasiopterus*) (Kerth, Ebert, & Schmidtke, 2006; Popa-Lisseanu, Bontadina, Mora, & Ibanez, 2008; Zeale, Davidson-Watts, & Jones, 2012). Notons également que ce changement n'est pas rare chez des espèces troglodytes qui forment de larges colonies, comme le Murin de Capaccini (*Myotis capaccinii*) (Papadatou, Butlin, & Altringham, 2008).

La plupart des grandes colonies, comme celles décrites précédemment, se forment au sein de larges cavités souterraines, naturelles ou artificielles. Ce sont des gîtes rares, mais stables et pérennes dans le temps, en comparaison à des abris forestiers, comme des gîtes dans des arbres creux ou sous des écorces par exemple. Les cavités permettent aux chauves-souris de se protéger des prédateurs, des intempéries, offrent un habitat sûr pour les nurseries et un microclimat adapté aux exigences physiologiques, notamment lors des phases critiques de mise-bas et d'hibernation.

Les changements et la fréquence d'utilisation des gîtes à différentes périodes de l'année, dépend de l'espèce elle-même, de son cycle biologique (mise-bas, transit, hibernation), du sexe des individus mais également de différents paramètres environnementaux biotiques et abiotiques et de leurs variations (température, hygrométrie, ressource alimentaire, pression parasitaire, etc.) (Altringham, 2011; Dietz, 2009).

La formation de larges colonies procure un certain nombre d'avantages comme la diminution du risque de prédation, notamment lors de la sortie du gîte car lorsque la taille de la colonie augmente le risque diminue. La formation d'essaim pour la mise-bas ou l'hibernation abaisse le coût énergétique de la thermorégulation (J. Speakman, Irwin, Tallach, & Stone, 1999; Willis & Brigham, 2004). Lors de l'élevage des jeunes, grâce à la coopération et au transfert d'informations, la vie en groupe favorise le développement des jeunes, diminue le coût énergétique lié à la recherche des sites de nourrissage et favorise la survie des individus (Kerth & Reckardt, 2003; J. R. Speakman, Thomas, Kunz, & Fenton, 2003; Wilkinson, 1992). Mais le rassemblement de chauves-souris en grand nombre a également des inconvénients. Outre la compétition intra- ou interspécifique liée à la ressource alimentaire qui peut survenir en fonction des variations environnementales, les chauves-souris peuvent altérer leur propre habitat et leur propre état de santé. En effet, en produisant une grande quantité de guano et d'urine, extrêmement riche en nitrate et en ammoniac, à l'intérieur de leur gîte, elles développent leur propre écosystème qui favorise l'apparition, le maintien et la transmission de parasites et de maladies au sein de la colonie (Altringham, 2011).

3- Migration et dispersion

La migration, la dispersion et les mouvements saisonniers sont des événements clefs du cycle biologique des chiroptères et ce, malgré les risques de mortalité importants, inhérents à ces déplacements, notamment sur de longues distances : mauvaises conditions climatiques, difficultés pour

retrouver un gîte sûr et une zone de nourrissage, coût énergétique... (Ruth L. Angell, Roger K. Butlin, & John D. Altringham, 2013; Milner-Gulland, Fryxell, & Sinclair, 2011). Au-delà des mouvements locaux et quotidiens pour les activités de chasse par exemple, de nombreuses espèces de chiroptères peuvent se déplacer sur une centaine de kilomètres pour effectuer des migrations saisonnières comme le Murin de Bechstein (*Myotis bechsteinii*), le Minioptère de Schreibers (*Miniopterus schreibersii*) ou le Murin de capaccini (*Myotis capaccinii*) (Papadatou, Butlin, Pradel, & Altringham, 2009; Reckardt & Kerth, 2007; Rodrigues & Palmeirim, 2008). Certaines sont capables de réaliser des migrations régionales sur de plus longues distances, plusieurs centaines de kilomètres pour le Murin de Daubenton (*Myotis daubentonii*) ou le Grand Murin (*Myotis myotis*). D'autres effectuent des migrations sur plus de mille kilomètres, comme la Grande Noctule (*Nyctalus noctula*) ou la Pipistrelle de Nathusius (*Pipistrellus nathusii*) (Hutterer, 2005; Russ, Hutson, Montgomery, Racey, & Speakman, 2001). Ces comportements sont initiés par différents facteurs biotiques ou abiotiques : les conditions climatiques, la température des zones de nourrissage et/ou des gîtes, influençant les ressources alimentaires locales et les micro-habitas disponibles dans une cavité, la disponibilité en gîtes sur une aire géographique, ou encore le cycle biologique des espèces, notamment la reproduction (Fleming, Eby, Kunz, & Fenton, 2003).

D'autres paramètres tels que le sexe, l'âge, les besoins physiologiques ou encore les comportements individuels induits par l'environnement proche ainsi que par les relations intraspécifiques ont un rôle très important dans les schémas de migration saisonniers ou régionaux (Ruth L. Angell, Roger K. Butlin, & John D. Altringham, 2013). Chez une espèce telle que le Minioptère de Schreibers (*Miniopterus schreibersii*), dès la fin de l'hibernation les femelles migrent vers leurs sites de printemps, puis se déplacent à nouveau vers leurs sites de mise-bas, juste avant la parturition. On constate une très forte phylopatricité chez les jeunes femelles et femelles adultes. Il est rare qu'une femelle choisisse un site de mise-bas différent de celui où elle est née. Dès le sevrage des jeunes, les femelles migrent en direction des gîtes d'automne ou, selon le cas, directement vers les gîtes d'hiver. Les mâles suivent sensiblement le même schéma, mais quittent leurs sites d'hibernation légèrement en décalé, après le départ des femelles et restent beaucoup plus mobiles au printemps et durant la période de mise-bas et d'élevage des jeunes. À l'automne, ils sont capables de se déplacer sur de plus longues distances pour trouver un gîte occupé par les femelles afin de se reproduire, et y passent habituellement l'hiver, rééquilibrant ainsi le sex-ratio des colonies. La dispersion des juvéniles est un facteur clef de la variation du flux génétique au sein d'une population, seulement ici, la forte phylopatricité des femelles adultes et des jeunes femelles, induit le rôle important des mouvements migratoires des mâles dans les échanges génétiques (Moussy et al., 2013; Rodrigues & Palmeirim, 2008).

Outre ces migrations liées aux cycles biologiques, des individus, des groupes familiaux ou des colonies, peuvent être amenés à se déplacer pour faire face aux contraintes d'un gîte devenues trop importantes pour garantir leur propre survie ou celle de leurs jeunes (Hutterer, 2005; Kerth, Klaus, & Barbara, 2001; Rodrigues & Palmeirim, 2008). En effet, au delà des besoins physiologiques liés à la recherche d'un gîte offrant un optimum de température et d'hygrométrie, les déplacements de chiroptères peuvent être initiés par la nécessité de se soustraire à une pression parasitaires trop importante. Les mouvements fréquents et l'utilisation d'un réseau de gîtes peuvent perturber ou interrompre le cycle de reproduction d'ectoparasites et ainsi protéger les groupes sociaux et à plus large échelle, les colonies, d'importantes infestations parasitaires (Bartonicka & Gaisler, 2007; Reckardt & Kerth, 2007).

La biologie des espèces, la structure sociale des groupes populationnels, les interactions intra- et interspécifique et les pressions environnementales que subissent les chauves-souris au cours de leur cycle de vie, orientent les flux génétiques au travers des différents types de migrations. La diversité et la complexité de ces comportements vont donc avoir une influence significative mais différente sur la génétique et la structure des populations ainsi que sur leurs dynamiques spatiales (Moussy et al., 2013) permettant aux agents infectieux d'avoir accès à une grande diversité structurelle pour assurer leur survie et leur dispersion (Calisher CH, 2006).

4- Le « swarming »

Ce phénomène complexe, qui n'est pas encore totalement compris, débute vers le milieu de l'été et se termine à la fin de l'automne, et concerne principalement des espèces de vespertilionidés, comme les *Myotis*, *Eptesicus*, *Plecotus* et *Barbastella*. Les chauves-souris se regroupent à l'entrée, autour et dans des cavités souterraines, naturelles ou artificielles, pour se reproduire et possiblement transmettre des informations sur les sites d'hivernages, notamment aux jeunes de l'année. Des comportements d'appariement et des états physiologiques avec des signes extérieurs, comme les épидидymes gonflées par exemple, sont observées dès la tombée de la nuit : vols incessants, poursuites entre individus, vocalisations importantes (Rivers, Butlin, & Altringham, 2006). Un même site peut rassembler des centaines voir des milliers de chauves-souris, de plus de dix espèces différentes, en une seule nuit et de façon répétée tout au long de la saison de reproduction (Altringham, 2011; Bogdanowicz, Piksa, & Tereba, 2012). Un site de « swarming » peut être utilisé ponctuellement, déserté durant la journée et fréquenté uniquement durant la nuit, ou pourra être utilisé plus fréquemment, comme un gîte d'hibernation. Les individus commencent à se regrouper quelques heures après le coucher du soleil, avec un pic d'activité en milieu de nuit. On constate un très fort déséquilibre du sex-ratio en faveur des mâles, de l'ordre de 70 à 95 % (Glover & Altringham, 2008). D'un point de vue génétique le « swarming »

apparaît ici comme un phénomène important dans le transfert de gènes entre les populations, notamment pour les plus sédentaires comme le Murin de bechstein (*Myotis bechsteinii*) ou l'Oreillard roux (*Plecotus auritus*) présentant un haut niveau de phylopatricie spécifique aux gîtes journaliers utilisés durant l'été, comme pour ceux utilisés durant l'hiver. Ces rassemblements permettent une augmentation de la diversité génétique et une diminution du risque de consanguinité, mais peuvent également être considérés comme un haut lieu de transfert pour les agents infectieux (Bogdanowicz et al., 2012; Parsons, Jones, & Greenaway, 2003; Poissant & Broders, 2008).

5- Les agents infectieux et vecteurs

Dans cette étude nous entendons par agent infectieux un agent biologique pouvant être à l'origine d'une maladie infectieuse. Ce sont majoritairement des micro-organismes comme des bactéries, des protozoaires ou encore des virus. On mesure leur pouvoir pathogène par l'augmentation de la mortalité qu'ils entraînent. La transmission entre individus infectés à individus sains peut se faire de façon directe, par simple contact ou de façon indirecte par le biais de vecteurs comme des ectoparasites inféodés à une espèce ou à un groupe d'espèces proches, ou encore par des insectes hématophages considérés comme « piqueurs » et plus généralistes, comme les moustiques.

Les chiroptères sont considérés comme étant un réservoir important d'agent infectieux pouvant passer la barrière des espèces (Calisher CH, 2006; Wong et al., 2011)) et comme la plupart des mammifères, les chauves-souris ont un important cortège d'ectoparasites. On retrouve principalement des diptères hématophages aux ailes atrophiées comme les *Streblidae* ou les *Nycteribiidae* vivant dans la fourrure ou sur le patagium, mais également des mites, des acariens de la famille des *Spinturnicidae* vivant également sur la membrane des ailes (Zahn & Rupp, 2004). L'ancienneté du taxon et la longue histoire commune entre les chiroptères, leurs agents infectieux et leurs parasites, suggère une longue histoire de cospéciation et de coévolution (Badrane & Tordo, 2001; Bruyndonckx, Dubey, Ruedi, & Christe, 2009; Calisher CH, 2006).

La course aux armements provoquée par le système hôte/parasite entraîne des adaptations physiologiques, immunologiques et comportementales (van Schaik, Kerth, Bruyndonckx, & Christe, 2014). En effet, les ectoparasites jouent un rôle non négligeable dans le comportement des chauves-souris et dans les relations qu'elles entretiennent avec leur environnement. Inversement, les traits d'histoire de vie des chauves-souris influent sur les stratégies des agents infectieux (Reckardt & Kerth, 2009). Une forte pression parasitaire chez un individu entraîne un stress important, un changement de comportement, en comparaison avec un individu non parasité (Bartonicka & Gaisler, 2007; Dizney & Dearing, 2013), provoquant une augmentation des dépenses énergétiques pour se gratter, se lécher, ou tenter de capturer les parasites pour les éliminer. Les hôtes peuvent également adapter leur comportement quotidien afin de diminuer la pression parasitaire liée à leur habitat. Par exemple, la

Pipistrelle commune (*Pipistrellus pipistrellus*) ou le Grand murin (*Myotis myotis*) changent de gîte très régulièrement. Quelques jours après leur départ, la population de parasites, notamment les nymphes, diminue de moitié (Bartonicka & Ruzickova, 2012), mais les parasites peuvent également s'adapter. Bon nombre d'ectoparasites ont synchronisé leur cycle de reproduction avec celui de leur hôte (Bartonicka & Gaisler, 2007), comme des *Nycteribiidae*, des mites ou encore des tiques qui augmentent leur taux de reproduction durant les phases de gestation, de lactation et d'élevage des jeunes de leur hôte, le Minioptère de Schreibers (*Miniopterus schreibersii*). Ce dernier étant troglodyte et ne pouvant changer de gîte aussi régulièrement que des espèces forestières, limiterait la pression parasitaire, de façon générale, par le choix de gîtes de grande superficie et après la saison de reproduction, par le choix de gîtes offrant de basses températures limitant les conditions favorables au développement des parasites (Lonrenco & Mestre Palmeirim, 2008).

Ces pressions parasitaires induisent donc des changements de comportement chez les hôtes et des déplacements géographiques, influençant d'une part, la structuration génétique des populations et d'autre part, la condition physique des chauves-souris, en provoquant des dépenses énergétiques supplémentaires à des périodes sensibles du cycle biologique. L'ensemble de ces facteurs ne peut qu'influencer la circulation des agents infectieux au sein d'une population.

Chiroptères et éco-épidémiologie des communautés

La diversité spécifique des chiroptères et la richesse de leurs traits d'histoire de vie, offrent donc un excellent modèle d'étude en éco-épidémiologie des maladies infectieuses. Il est probable que la diversité des modes de vie et des traits d'histoire de vie se traduise par de grandes différences en termes de transmission des agents infectieux, que ce soit entre individus d'une même population ou appartenant à des populations différentes, ou encore, entre individus d'espèces différentes. Les taux de contacts entre espèces et la proximité phylogénétique entre les espèces sont suspectés être deux facteurs importants pouvant influencer l'intensité du changement d'espèces hôtes. La présence potentielle au sein d'une même espèce hôte de plusieurs agents infectieux pose la question de leurs interactions. De plus en plus d'études prenant en compte les infections multiples dans les populations naturelles se mettent en place (Barton et al., 2007; Hellard et al., 2011; Ockenga J, 1997). En effet, il y a nécessité de développer des approches expérimentales mais aussi méthodologiques pour identifier les agents infectieux qui interagissent biologiquement et la nature de leurs relations (synergiques ou antagonistes). On s'attend ainsi à ce que l'analyse comparative de différents contextes intra- et interspécifiques (modes de vie, structures de populations des chiroptères et des parasites, structure des assemblages

d'espèces, etc.) permette de révéler les facteurs de risque favorisant les niveaux de transmission des agents infectieux intra- et inter-espèces.

En épidémiologie, le patron de circulation des agents infectieux est une donnée de première importance, puisqu'il détermine en grande partie les pressions de sélection qui s'exercent sur les communautés d'hôtes et d'agents infectieux. L'ensemble des informations que nous pourrions obtenir sur la fréquence des infections en relation avec les structures de population ou des communautés de chauves-souris pourra alors se révéler précieuse une fois replacée dans une perspective d'évolution ou de coévolution des agents infectieux et dans un contexte de conservation des espèces.

Le but de ce projet à long-terme est d'étudier les mécanismes éco-épidémiologiques au travers des viromes des communautés de chiroptères plurispécifiques en approfondissant nos connaissances sur la biologie et l'écologie des populations des chauves-souris. Les objectifs sont les suivants :

- Identifier les structurations génétiques des populations et des communautés.

Quelle est l'intensité du flux génétique au sein des populations ? Quels sont les facteurs environnementaux (disponibilité en gîtes, pression anthropique, etc.) et les facteurs intra- et interspécifiques (migration, agents infectieux, etc.) et leurs variations spatiales et temporelles qui modulent les interactions entre les différentes populations et leurs évolutions ? Quelle est la taille efficace des populations de chauves-souris ? Quelles sont les caractéristiques biologiques, génétiques, comportementales ou historiques régissant l'assemblage des communautés d'espèces (comme la distance phylogénétique entre espèces) ? Quelle est la dynamique populationnelle des communautés (variations d'effectif, sex-ratio, densité-dépendance, synchronie, etc.) ?

- Identifier les agents infectieux présents dans les communautés et leurs possibles vecteurs.

Quels sont-ils (identifier et séquencer les virus, les replacer dans la phylogénie, etc.) ? Sont-ils transmis par vecteur, et quels sont-ils ? Quelle est leur répartition géographique ? Leur prévalence ? Quels sont les facteurs de risque (sexe, âge, etc.) ? Peut-on définir et lier une communauté virale à celle de leurs hôtes associés ? Quelles sont les pressions de sélection qui s'exercent sur cette communauté d'agents infectieux ? Quel est le degré de spécialisme/généralisme des agents ?

- Evaluer les interactions entre les virus.

Les agents infectieux circulent-ils de manière indépendante ? Y a-t-il des interactions biologiques de nature synergique ou antagoniste qui pourraient moduler leur taux de transmission ?

- Décrire les patrons de diffusion des agents infectieux.

Quelle est la prévalence intra- et interspécifique ? Quelles sont les fréquences, les forces de transmission des agents infectieux entre individus au sein des espèces, entre espèces et entre gîtes ?

- Caractériser et étudier les pressions de sélection qui s'exercent sur le système hôtes-parasites des chiroptères.

Quelles sont les caractéristiques du système hôte/parasite qui déterminent les stratégies des agents infectieux (gradient spécialisme-généralisme) et leurs évolutions possibles ? Quels sont les facteurs influençant le taux de franchissement des espèces ?

En effet, les chauves-souris peuvent se déplacer aisément et vivre dans des habitats confinés, au sein de communautés multispécifiques, ce qui peut favoriser la persistance de souches virales généralistes qui sont capables d'infecter les différentes espèces présentes et ainsi de persister avec l'augmentation de l'immunisation des populations. Dans cette dernière partie nous souhaitons croiser l'ensemble des informations et des résultats que nous aurons pu obtenir afin d'évaluer les différents scénarios concernant les mécanismes œuvrant dans la transmission inter-espèces des agents infectieux et leurs évolutions. Ainsi l'ensemble des données accumulées dans les tâches précédentes sera intégré pour générer un modèle de transmission virale, spatialisé et basé sur les interactions intra- et interspécifiques. Cela nous permettra d'apporter des éléments de réponse sur le véritable impact des agents infectieux sur les populations de chiroptères, sur les réponses évolutives des systèmes hôte-parasite et sur les mécanismes éco-épidémiologiques régissant les passages des agents infectieux entre différentes espèces et les pressions de sélections associées.

Deuxième partie : Mise en œuvre du projet

Notre projet de recherche sur l'éco-épidémiologie des communautés de chiroptères en France métropolitaine, et les questions qui en découlent, définissent un certain nombre de contraintes et de besoins liés à l'étude, notamment en termes de données biologiques. Afin de répondre à ces besoins, nous désirons mettre en place des phases d'échantillonnage, indispensables à l'étude, à travers une approche « habitat » et « espèces ». En effet, deux aspects de l'écologie et de la biologie des chiroptères nous semblent particulièrement intéressants pour appuyer la mise en œuvre de cette étude :

- Le regroupement de plusieurs centaines d'individus en colonies mono- ou plurispécifiques
- L'utilisation de gîtes, naturels ou artificiels, à différentes périodes de l'année par diverses espèces

Echelle géographique

Malgré la vocation nationale de notre projet, nous désirons dans un premier temps et pour des raisons évidentes de pertinence d'action, débiter notre étude au niveau régional. Les connaissances « locales » de l'écologie des communautés de chiroptères, leur fonctionnement saisonnier ainsi que leur historique sont des éléments clefs de la réussite d'un tel projet.

Les régions concernées à l'heure actuelle sont Poitou-Charentes, Aquitaine, Languedoc-Roussillon, Provence Côte d'azur. Ces régions nous offre un support d'étude parfaitement adapté à nos besoins. Le peuplement chiroptérologique se caractérise par une importante diversité spécifique associée à des effectifs conséquents.

Des échanges et des discussions sont actuellement en cours avec ces régions afin d'adapter notre étude au contexte local en fonction des enjeux de conservation, des interrogations scientifiques locales et de leur volonté à intégrer directement le projet.

Ethique

La méthodologie et nos protocoles d'échantillonnage ont été évalués et affinés dans le but de garantir le bien-être animal à la suite d'une pré-étude menée durant trois années (2010 à 2012) sur l'éco-épidémiologie des chauves-souris de Guyane, mais également à partir d'une bibliographie récente, sur des retours d'expériences d'autres équipes de recherche et au travers d'échanges et de discussion avec des chiroptérologues de divers groupes régionaux.

Afin de minimiser au maximum le dérangement des colonies et l'impact sur les gîtes, la phase de collecte de données s'échelonne sur un maximum de une à trois nuits consécutives par site et aucun échantillonnage n'aura lieu durant la phase d'hibernation des chauves-souris.

Lors des phases de prélèvements, une chauve-souris présentant des signes de détresse trop importants ne sera pas échantillonnée et sera immédiatement relâchée sur le site de capture. De plus, selon le cas, la chauve-souris, pourra être mise à l'abri et en sécurité dans un sac de contention adapté afin qu'elle retrouve un état jugé favorable avant d'être relâchée.

Les communautés d'espèces

Dans le cadre de notre étude, nous entendons par « communautés de chiroptères », un ensemble d'espèces de chauve-souris utilisant un même gîte à un moment donné de leur cycle biologique, que ce soit de manière éparse, en essais plurispécifiques et/ou en essais monospécifiques.

Au vu de la mortalité exceptionnelle du Minioptère de Schreibers (*Miniopterus shreibersii*) qui a eu lieu en 2002, en Espagne, au Portugal et en France, il nous a semblé pertinent de définir cette espèce comme étant une espèce « cible » pour mettre en œuvre notre projet. De plus, ces événements sont très certainement liés à des épisodes zoonotiques importants qu'il serait opportun d'approfondir. Le choix de cette espèce est également renforcé par différents aspects de sa biologie et de son écologie qui offrent des perspectives de recherche intéressantes. En effet, le Minioptère de Schreibers est une espèce considérée comme étant strictement cavernicole et très largement répartie en Europe (Albayrak & Coskun, 2000; Bllgln et al., 2006). Durant la période de reproduction, les nurseries peuvent atteindre plusieurs milliers d'individus et comptent majoritairement des femelles et leurs jeunes. Les mâles et les individus non reproducteurs forment des groupes épars et séparés dans la même cavité ou dans des cavités proches. On constate une très forte philopatrie des femelles adultes et des jeunes femelles pour leur site de reproduction. Certaines grandes cavités sont utilisées toute l'année pour l'ensemble des phases biologiques, alors que d'autres ne le sont que pour le transit, la reproduction ou l'hibernation (Benda et al., 2003). Les individus, notamment les mâles, au moment de la reproduction, peuvent réaliser des déplacements saisonniers plus ou moins importants entre les gîtes, de quelques dizaines à plusieurs centaines de kilomètres. Contrairement aux autres espèces de chiroptères européens, les femelles de Minioptères sont directement fécondées après l'accouplement, il n'y a pas de diapause, c'est le développement de l'embryon que est bloqué durant toute la période hivernale. Les essais formés par le Minioptère de Schreibers sont très denses. Rarement seuls, plusieurs espèces troglaphiles lui sont

associées, en fonction des phases d'hivernage (hiver) et de reproduction (été) (Dietz, 2009; Godineau & Pain, 2007).

Afin de répondre aux objectifs de l'étude, nous souhaiterions échantillonner en priorité les communautés d'espèces associées au Minioptère de Schreibers par la mise en œuvre d'un échantillonnage « fixe » en sortie de gîte (cf. p21). Sa grande sociabilité, nous permet de former deux larges groupes d'espèces associées en communautés saisonnières (été et hiver) pouvant faire l'objet de prélèvements.

Nous considérons comme espèces associées principalement en hiver :

- Grand Rhinolophe, *Rhinolophus ferrumequinum*
- Petit Rhinolophe, *Rhinolophus hipposideros*
- Rhinolophe euryale, *Rhinolophus euryale*
- Grand Murin, *Myotis myotis*
- Petit Murin, *Myotis blythii*
- Murin à oreilles échancrées, *Myotis emarginatus*
- Murin de Bechstein, *Myotis bechsteinii*
- Murin de Daubenton, *Myotis daubentonii*
- Murin de Capaccini, *Myotis capaccinii*

Nous considérons comme espèces principalement associées en été :

- Grand Rhinolophe, *Rhinolophus ferrumequinum*
- Rhinolophe euryale, *Rhinolophus euryale*
- Grand Murin, *Myotis myotis*
- Petit Murin, *Myotis blythii*
- Murin à oreilles échancrées, *Myotis emarginatus*
- Murin de Capaccini, *Myotis capaccinii*

Néanmoins, ces listes d'espèces ne sont pas fixes et exhaustives. Les configurations des communautés et les effectifs associés aux espèces peuvent être extrêmement variables en fonction de la région et de la période. De plus, un échantillonnage « opportuniste » (cf. p21) qui pourra être réalisé parallèlement afin d'affiner les structures génétiques des populations, ne permettra pas de cibler une espèce particulière, le résultat des captures étant aléatoire même si les habitats ou les zones géographiques sont déterminées préalablement. Par conséquent, **l'ensemble des espèces de chiroptères présentes en France peut être sujet à capture sauf Rhinolophe de Mehely et Murin des marais (Annexe 1) et pourra faire l'objet de prélèvements biologiques** à condition que ces dernières répondent aux critères d'échantillonnages

déterminés - notamment en fonction de la masse des individus (cf. p26) - afin de limiter au maximum l'impact sur les individus.

Prélèvements biologiques et importance du cycle de vie des chiroptères

Le tableau ci-dessous présente les différents prélèvements biologiques nécessaires à l'étude et pouvant être effectués sur les chauves-souris capturées ainsi que les analyses associées, afin de répondre aux divers questionnements du projet :

Prélèvements	Objectifs
Peau	Analyses génétiques
Sang	Diagnostic agents infectieux, métagénomique
Poils	Analyses isotopiques, dosages hormonaux
Fèces	Diagnostic agents infectieux, métagénomique, régime alimentaire
Urine	Diagnostic agents infectieux
Ectoparasites	Recherche de vecteur d'agent infectieux et des agents eux-mêmes

Selon le type d'échantillonnage mis en place, « fixe » ou « opportuniste » présenté ci-après, il ne sera pas forcément possible de réaliser l'ensemble de ces prélèvements sur un seul et même individu. Premièrement, pour des raisons évidentes de disponibilité (fèces, urine, ectoparasites) et deuxièmement pour des raisons techniques, présence ou non de personnes qualifiées et autorisées à effectuer ce type de prélèvements.

Afin de réaliser au mieux la recherche des agents infectieux circulant dans les communautés de chiroptères, il est important de prendre en considération le cycle biologique des espèces (fig.1) et de pouvoir effectuer des prélèvements sur des individus à différentes phases de leur cycle de vie. En effet, la variation de l'âge et du sex-ratio des groupes d'individus présents dans les gîtes ainsi que la condition physique et physiologique des individus sont des variables de première importance dans l'analyse des résultats et dans la compréhension du système hôte-parasite et de son évolution. **Les individus ne sont pas sensibles de la même manière à la pression des agents infectieux (virus, parasites, ectoparasites) en fonction de leur âge, de leur sexe, de leur état de santé et de leur état physiologique.**

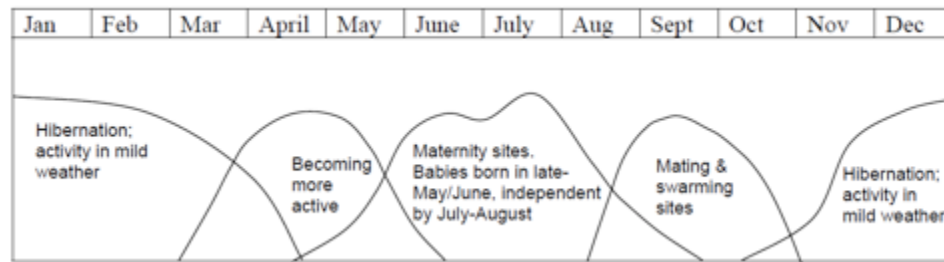


Figure 1 : Phénologie générale du cycle biologique des chauves-souris - In Bat mitigation guidelines, january 2004, A. J. Mitchell-Jones

L'objectif optimal de notre échantillonnage est donc de pouvoir obtenir des prélèvements biologiques représentatifs des variations physiologiques individuelles induites par les différentes phases annuelles du cycle biologique. **Nous envisageons d'échantillonner 50 individus/espèce/gîte/an, (minimum 30, maximum 150).** Avec l'avancé de l'étude, le nombre d'individus à échantillonner pourra être ajusté, en concertation avec les chiroptérologues locaux en fonction des enjeux de conservation, de la taille des communautés, des difficultés rencontrées et des résultats obtenus notamment sur la prévalence des agents infectieux.

Les différents stades biologiques et physiologiques ciblés chez les individus échantillonnés sont :

- Sortie d'hivernage : les sessions organisées au printemps, lors du retour de l'activité, nous informeront sur la charge virale et parasitaire des individus après l'hibernation (mâles et femelles)
- Gestation* : Le développement d'un embryon à l'intérieur de l'organisme, entraîne un changement d'état physiologique qui peut moduler la sensibilité de l'individu aux agents infectieux. Par exemple, la diminution et l'adaptation des réponses du système immunitaire peuvent être propices au développement et à la circulation des agents infectieux. L'analyse et les résultats issus des informations recueillies lors de ces phases d'échantillonnage, représentent des éléments clefs dans la compréhension de l'éco-épidémiologie des chiroptères. Ils nous permettront d'évaluer l'impact de l'état physiologique sur la sensibilité des individus aux agents infectieux et sur leur circulation au sein d'une communauté.
- Lactation / post-lactation* : les sessions organisées au moment de l'émancipation des jeunes, en fonction des possibilités liées à l'espèce, sur des femelles lactantes et post-lactantes, nous permettront d'appréhender et de suivre le rôle de l'état physiologique sur la charge virale et parasitaire, au même titre que précédemment et de le comparer à des femelles non-reproductives.
- Juvéniles : ces sessions auront pour objectif de capturer les jeunes volants émancipés de l'année afin d'évaluer leurs charges virales (jeunes mâles et femelles).

- Phase de reproduction : sessions organisées à l'automne afin d'appréhender les flux génétiques et le rôle de cet état physiologique sur la transmission et sur la circulation des agents infectieux dans les populations.
- Phase de pré-hivernage : Les sessions organisées au cours de l'automne sur des sites considérés comme gîtes d'hivernages nous permettront d'évaluer la charge virale post-reproduction et pré-hibernation, phase critique du cycle biologique faisant intervenir des adaptations physiologiques particulières.

* Remarque : Nous sommes conscients de la phase sensible que représentent la gestation et la lactation chez les chiroptères. Néanmoins ces états physiologiques peuvent représenter des phases de vulnérabilité vis à vis des agents infectieux. Compte tenu de ce contexte particulier, nous avons choisi d'adapter nos protocoles de captures afin de minimiser au maximum la pression de capture et ainsi éviter les désertions de sites. Lors des phases de gestation et de lactation, **une seule nuit de capture en sortie de gîte sera mise en œuvre** au lieu des trois nuits prévues initialement, comme pour les autres phases du cycle. Pour les femelles gestantes, nous tenterons d'effectuer les captures sur des sites de transits, avant leur installation sur les gîtes de parturition.

Stratégie d'échantillonnage

Afin de diminuer les risques de dérangement des chauves-souris au gîte, notamment liés à la répétabilité intra- et interannuelle des sessions de capture, nous avons réorienté et allégé notre stratégie d'échantillonnage. En effet, suite aux divers échanges et discussions engagés avec des chiroptérologues des groupes régionaux, une nouvelle stratégie a été définie ; nos sessions d'échantillonnages seront basées sur l'utilisation saisonnière des gîtes par les communautés d'espèces (transit printanier, mise bas/élevage des jeunes, transit automnal) et non sur les phases biologiques comme prévu initialement.

Type de gîte	Nombre de passage annuel	Individus ciblés
Transit printanier	1 à 2 max par gîte	- Individus en sortie d'hivernage - (Femelle en début de gestation, si envisageable)
Mise bas	1 par gîte	- Femelle allaitante et/ou post allaitante
Transit automnal	1 à 2 max par gîte	- Individus en reproduction (mâle/femelle) - Juvénile volant

Ce compromis nous permettra de répondre à nos objectifs d'étude à long terme : capturer et réaliser des prélèvements sur des individus à différents stades de leurs cycles de vie, tout en réduisant la pression de capture sur les gîtes choisis. Le nombre de session de capture est réparti annuellement sur différents sites, diminuant ainsi la pression d'échantillonnage liée à la répétabilité de l'étude : 1 à 2 passages par site contre 4 à 6 auparavant.

Différents types d'échantillonnage

Afin de répondre à nos besoins en termes d'échantillonnage, trois stratégies d'acquisition de données seront mises en place au cours de cette étude. Un échantillonnage qualifié de « fixe » et un échantillonnage « opportuniste » pour les prélèvements biologiques liés aux espèces et enfin un échantillonnage « Habitat » pour effectuer des prélèvements liés aux gîtes.

- Echantillonnage « Fixe »

L'échantillonnage fixe correspond à notre phase de travail principale. Il sera mis en place sur des gîtes pérennes (cavités, abris anthropiques) afin d'appliquer un protocole standardisé, répétable dans le temps et sur les différents sites sélectionnés. Ces derniers seront préalablement définis en collaboration avec les chiroptérologues locaux après avoir hiérarchisé les sites potentiels en fonction des enjeux de conservation, des conflits d'usage, des propriétaires, de l'accessibilité physique et de nos besoins scientifiques. Ils doivent répondre aux critères suivants : i) être des abris naturels ou artificiels accessibles à la méthode de capture, ii) abriter des espèces d'une masse supérieure ou égale à 9 grammes, iii) se composer de colonies pluri- ou monospécifiques de plus de 100 individus. L'échantillonnage fixe nous permettra donc de réaliser nos prélèvements biologiques, notamment le sang pour effectuer le diagnostic des agents infectieux et les biopsies de peau pour les études génétiques, ainsi que les autres prélèvements listés précédemment. Il nous permettra également d'acquérir les principales données biométriques (masse, longueur avant-bras...) et biologiques (sexe, âge, état physiologique...) indispensables aux analyses.

- Echantillonnage « Opportuniste »

Parallèlement à l'échantillonnage « Fixe », un échantillonnage « Opportuniste » pourra également être mis en œuvre en fonction des possibilités. Cet échantillonnage sera réalisé dans un environnement géographique à plus large échelle et sur des espèces capturées aléatoirement à différentes périodes de leur cycle de vie. Cet échantillonnage a pour but de recueillir des données principalement biométriques et des prélèvements biologiques (peau, poils, fèces) nous permettant i) de mieux cerner les zones géographiques liées aux populations, ii) d'appréhender le flux génétique entre les différentes populations et d'évaluer

leurs possibles interactions, iii) de tenter de définir des « couloirs » de déplacement et/ou des routes migratoires, iv) d'enrichir nos connaissances sur les habitats de chasse et les régimes alimentaires, v) d'approfondir nos connaissances sur les espèces cryptiques.

- Echantillonnage « Habitat »

Outre les prélèvements biologiques proprement dits, qui seront effectués sur les différentes espèces de chauves-souris, nous aurons besoin de réaliser des échantillonnages ponctuels liés aux gîtes. Des prélèvements de fèces seront effectués sur les tas de guanos, au sein des gîtes, afin de déterminer une « signature virale » de la cavité à un instant t . La répétition de ces prélèvements à différentes périodes du cycle biologique et leurs comparaisons nous informeront peut-être sur une évolution possible de la « charge virale » des communautés de chiroptères. Parallèlement, ce diagnostic des agents infectieux sur les fèces sera comparé aux résultats du diagnostic effectué sur les prélèvements sanguins afin d'évaluer de nouvelles méthodes d'échantillonnage moins intrusives pour effectuer des recherches sur les agents infectieux.

De la même façon, la récolte et/ou la capture d'insectes piqueurs (tiques, moustiques, etc.) liés à l'habitat nous permettra d'affiner nos connaissances en termes de vecteur potentiel d'agents infectieux et de déterminer la « charge parasitaire » du gîte et son évolution dans le temps, en lien avec les périodes annuelles et le taux d'occupation du gîte par les chiroptères.

Méthodes de capture et évaluation de l'impact

Les sessions de capture seront organisées en adéquation avec la « Charte de déontologie pour la pratique de la capture des chiroptères » (Annexe 2) présentée dans le « Cahier technique pour l'identification des chiroptères en main et le relevé de données » (CTIC) conçu dans le cadre du Plan National d'Actions Chiroptères 2009-2013. Deux méthodes de capture sont envisagées pour cette étude, capture au filet type « Japonais » et capture au Harp-Trap.

Lors de l'échantillonnage « fixe » la méthode de capture au Harp-Trap en sortie de gîte sera privilégiée. L'utilisation du Harp-Trap permet aux chauves-souris piégées de ne pas rester emmaillotées dans un filet, ce qui impliquerait une intervention rapide des manipulateurs en plein milieu du flux de sortie pour les retirer. Le Harp-Trap permet aux chauves-souris capturées de glisser directement dans une « gouttière de contention » en coton, où libres de leurs mouvements, elles peuvent se déplacer et se positionner tête en bas sous un rabat de protection (plastique souple translucide). La « gouttière de contention » du Harp-Trap leur permet de conserver un comportement naturel durant cette courte captivité, de se regrouper en essaims par affinité intra- ou interspécifique, de diminuer le coût énergétique

lié à la thermorégulation, de rester au calme dans l'obscurité, de conserver leurs liens sociaux (toilettage, léchage) et assure la présence rassurante des congénères. Le dispositif est préparé 20/30 minutes avant la sortie des premiers individus. Son installation doit être sécurisée par un haubanage adapté, une ou deux personnes pourront rester à proximité du dispositif en toute discrétion (obscurité et silence) pour intervenir en cas de besoin. **L'objectif est seulement de capturer une partie du flux** et d'obtenir un nombre d'individus capturés en adéquation avec l'échantillonnage prévu.



Néanmoins, à la suite de divers échanges avec des chiroptérologues, si certaines régions sont contre l'utilisation du Harp-trap sur une sortie de gîte car les risques de dérangement auront été jugés trop importants ou si des sites potentiels ne se prêtent pas à l'utilisation de cet outil, nous choisirons la méthode de capture au filet « japonais ». Le dispositif sera mis en œuvre **non pas directement sous le porche de sortie, mais en extérieur, en recul, sur les flux de sortie préalablement identifiés**. Notons également que ces sessions de capture aux filets pourront être effectuées en seconde partie de nuit, lors du retour des individus au gîte. Les flux de retour étant plus diffus, la gestion des captures sera plus aisée pour les équipes de terrain, les flux des chauves-souris seront beaucoup moins impactés et perturbés par l'éclairage des filets lors du démaillage des individus et ces derniers auront déjà effectué des vols de nourrissage.

Les phases d'échantillonnage « opportunistes » correspondent à des sessions de capture organisées principalement sur les zones de nourrissage avec la mise en place d'un réseau de filets type « japonais ». Ces installations suivent les préconisations et les recommandations édictées par le MNHN. Le linéaire de filet déployé doit être en adéquation avec le nombre de personnes pouvant assumer la gestion du flux de capture et doit être sécurisé. L'intervention pour le démaillage doit être réalisée rapidement par les personnes habilitées. (Cf. Charte de déontologie pour la pratique de la capture des chiroptères)



Un dispositif pour l'évaluation de l'impact de l'échantillonnage en sortie de cavité sera mis en place, sur différentes sorties des gîtes concernés, sur plusieurs nuits avant, pendant et après la session de capture. Le protocole est basé sur la pose de SM2BAT+ afin d'évaluer le nombre de contacts/nuit sur la sortie qui serait choisie mais également sur des sorties secondaires pour prendre en compte le simple fait que les chauves-souris peuvent utiliser une sortie annexe en cas de « danger » identifié sur une sortie sans forcément désertier le site, sans oublier la notion d'évitement.

Protocoles d'échantillonnages

Les protocoles ont été établis à la fois pour obtenir des données précises et de qualité, pour respecter le bien-être animal et la sécurité du personnel impliqué dans les manipulations. L'équipe de terrain est constituée au minimum de trois ou quatre personnes afin d'optimiser le temps de manipulation des animaux. Dans le cadre de ce projet, le personnel amené à manipuler les chiroptères devra être vacciné contre la rage. La responsable du projet, Mme Dominique Pontier ainsi que Mr J-Baptiste Pons, en charge de la mise en œuvre des phases d'échantillonnage biologique, sont titulaires du diplôme « Expérimentation animale » de niveau I, agrément de laboratoire n°C692660703 et ont une grande expérience des études à long-terme sur les populations animales entraînant d'importantes phase d'échantillonnage et de manipulations.

Conformément à la nouvelle réglementation liée aux travaux scientifiques impliquant des espèces protégées, les captures de chauve-souris seront effectuées par des personnes ayant suivi la formation théorique « Capture et Manipulation des Chiroptères » mise en place par le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) et ayant une dérogation à l'interdiction de capture d'espèces protégées.

1. Organisation générale du camp de travail

Un laboratoire mobile est installé à proximité des grottes échantillonnées, à une distance suffisante pour éviter tous dérangements pouvant modifier le comportement naturel des chauves-souris durant la sortie de gîte : hors de portée visuelle (éclairage nocturne du laboratoire), hors des trajectoires utilisées par les différentes espèces (départ et retour des chauves-souris), limitation de la pollution sonore (en cas d'utilisation d'un groupe électrogène, le placer de façon suffisamment éloignée). Afin d'optimiser les conditions de travail de l'équipe, la qualité des prélèvements et de garantir le bien-être animal lors des manipulations, le laboratoire est constitué d'un abri étanche d'environ 10 m². A l'intérieur, une table de laboratoire pliante est installée sur laquelle est apposée un tissu de travail, jetable, renouvelé autant de fois que nécessaire afin de maintenir un niveau de propreté optimum pour la qualité des prélèvements et les manipulations des chauves-souris.



2. Organisation du flux de travail

Les sessions de capture et d'échantillonnage ne sont pas des actes anodins pour les chiroptères, elles doivent être mises en œuvre afin de veiller au bien-être animal, en limitant au maximum le stress des chauves-souris et la durée de manipulation.

Selon le nombre de personnes, la table de laboratoire est organisée en 3 ou 4 postes de travail pour optimiser le temps de manipulation de chaque individu à 6/7 minutes.

- Une personne « A » en charge la manipulation des chauves-souris : pesée du pochon avec la chauve-souris, sortie de la chauve-souris du pochon, auscultation et prélèvement des ectoparasites, sexage, évaluation de l'âge, biométrie (avant-bras...), présentation de la chauve-souris pour effectuer les différents prélèvements (sang, peau, etc.), point de compression suite à la prise de sang (uniquement dans le cas où l'équipe est constituée de trois personnes).
- Une personne « B » en charge de la pesée du sac vide, de la pose du transpondeur (selon les cas), du prélèvement de peau, de la prise de sang et du nettoyage des instruments de biopsie.
- Une personne « C » en charge de la préparation du matériel pour chaque chauve-souris (lecture

du transpondeur, étiquetage des Eppendorfs,...) et présentation des tubes et autres contenants auprès de la personne « B » pour collecter les échantillons prélevés et les entreposer durablement en fonction du choix de la méthode de stockage (sang total, RNA-Later, + 4/5°C, tube sec, etc.) et prise des notes sur les feuilles de terrain.

- En cas de présence d'une quatrième personne « D », la personne « A » ne prend plus en charge le point de compression et transmet la chauve-souris à « D », une fois les manipulations achevées. Cette quatrième personne prend en charge le bien-être animal avant de la relâcher. Elle s'assure notamment de la coagulation totale du point de ponction suite à la prise sang. Le cas échéant, à l'aide d'une micropipette, quelques gouttes d'eau peuvent être donnée à la chauve-souris avant que cette dernière ne soit relâchée. Cette quatrième personne se coordonne avec la personne « C » pour se partager l'organisation, la notation et l'archivage des prélèvements.

3. Fiches de terrain et mesures biométriques

Dans le cadre de notre étude, toutes les données récoltées lors des différentes sessions d'échantillonnage sont consignées sur des fiches de terrain avant d'être informatisées dans les plus brefs délais. L'ensemble des informations recueillies sera répertorié dans trois domaines de saisi différents, i) données de session, ii) données de capture, iii) données de prélèvement, en suivant les référentiels correspondants (Annexe 3 et 4).

Lors des sessions de capture qui seront réalisées, seules la masse et la longueur de l'avant-bras sont considérées comme des mesures prioritaires afin de minimiser le temps de manipulation. Néanmoins, afin d'affiner certains critères morphologiques nécessaires à la reconnaissance en main des chiroptères, l'ensemble des mesures biométriques présentées sur la fiche « Relevé de données biométriques par espèce » du CTIC pourront être relevées en fonction de leur degré de pertinence (systématique ou facultative) (Annexe 5), du temps de manipulation et du degré de stress de l'individu. Dans un souci d'harmonisation à l'échelle nationale, les méthodes et les moyens de mesures suivent les recommandations du CTIC.



4. Méthodes de prélèvements biologiques

Notons que l'ensemble des manipulations réalisées ainsi que les prélèvements biologiques pratiqués sont absolument nécessaires pour cette étude et ne peuvent être substitués par une méthode alternative. Les procédures d'échantillonnage présentées ici sont toutes qualifiées de « légère » dans la classification des procédures expérimentales du comité d'éthique en expérimentation animale (CECCAPP) présenté en annexe de l'arrêté du 1^{er} février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets scientifiques impliquant l'utilisation d'animaux dans les procédures expérimentales (Annexe 6).

- *Les prélèvements sanguins :*

Pour réaliser diverses études en virologie ou en épidémiologique, les prélèvements sanguins sont indispensables afin de déterminer certains paramètres hématologiques, biochimiques (McLaughlin et al., 2007) ou réaliser une simple recherche d'anticorps (Li W, 2005; Young et al., 1996). Aujourd'hui, avec les avancées technologiques en matière d'analyses moléculaires et de séquençage, une quantité minimale de sang, quelques dizaines de microlitres, sont suffisants pour assurer un diagnostic fiable (Ott Joslin, 2009). Dans le cadre de notre étude, les besoins minimums en échantillons sanguins sont de 50 μ l par individu pour la recherche d'agents infectieux et de quelques microlitres (2 à 5 μ l) collectés sur papier Whatman pour les individus de petites tailles ne pouvant faire l'objet d'une prise de sang.

Chez les mammifères, il est communément admis qu'un prélèvement unique de 1% de la masse totale d'un mammifère de petite taille (souris, rat...) peut être effectué sans risque pour l'animal (Olfert, Cross, & McWilliam, 1993; Ott Joslin, 2009). Chez les microchiroptères, les limites sont sensiblement les mêmes. Selon la littérature, la proportion de volume sanguin total varie entre 7 et 10 % de la masse totale, et il est conseillé de ne pas prélever plus de 10 % du volume de sang total d'un individu soit 1% de sa masse (Neuweiler, 2000; Smith, De Jong, & Field, 2010; Wimsatt, O'Shea, Ellison, Pearce, & Price, 2005). Pour des ponctions inférieures à 1%, le délai de retour à la normale du volume sanguin est en moyenne de 24 heures (Ott Joslin, 2009). Dans le calcul du volume de sang à prélever, il est important de

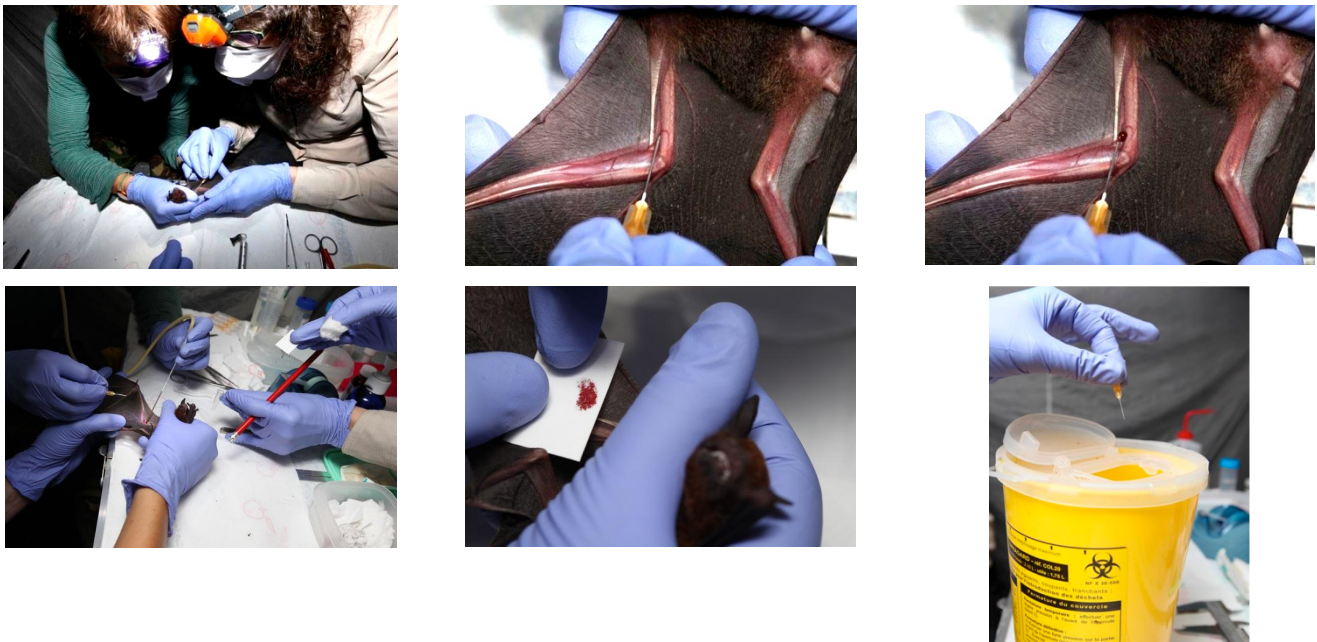
prendre en compte, la quantité perdue durant la réalisation du point de compression visant à favoriser l'arrêt du saignement. Pour ne pas infliger aux individus une perte supérieure à 1% de leur masse et limiter au maximum l'impact de nos prélèvements sur les individus manipulés, **nous avons choisi de réaliser des prélèvements sanguins à 6µl/g soit 0,6% de la masse totale** (Smith et al., 2010; Wimsatt et al., 2005).

Par conséquent, afin d'obtenir un volume sanguin suffisant de 50µl pour les analyses virologiques de notre étude, **seuls les chiroptères d'une masse supérieure ou égale à 9 grammes seront susceptibles d'être échantillonnés**. Les individus dont la masse sera inférieure à 9g pourront faire l'objet de prélèvements sanguins sur papier Whatman, soit 0,5 % de la masse totale. Les prélèvements sanguins se dérouleront sans anesthésie, par simple contention manuelle des chauves-souris. En effet, malgré une nette amélioration du matériel et une meilleure adaptation aux conditions de travail en extérieur (Lewis, 2004), effectuer une anesthésie sur le terrain peut se révéler rapidement très compliquée et contre-productive, particulièrement chez les très petits mammifères : gestion des gaz de type Isofluorane, risque d'hypothermie, contrôle difficile des fonctions vitales, risque élevé pour les femelles gestantes, temps de mise en œuvre pour chaque individu, etc. Réaliser des prises de sang sans anesthésie n'affecte en rien la survie des individus prélevés (Ellison et al., 2006; Gustafson & Damassa, 1985; Wimsatt et al., 2005).

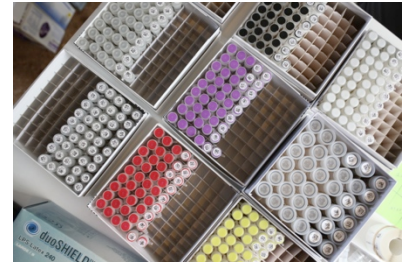
Les prélèvements doivent être effectués par des personnes expérimentées et dans des conditions de travail optimum : disponibilité du matériel nécessaire, ambiance calme et silencieuse, conditions adaptées pour garantir une durée de manipulation minimum, la sécurité de l'animal et des manipulateurs. Comme expliqué précédemment, les sessions d'échantillonnage durant lesquelles des prises de sang seront effectuées nécessitent la présence de trois personnes minimum, un premier manipulateur (A) pour maintenir la chauve-souris, un deuxième (B) pour la réalisation de la prise de sang et une troisième personne (C) pour la notation des données, la gestion du matériel nécessaire au prélèvement et pour l'archivage des échantillons.

La chauve-souris est maintenue sur le dos (A), l'aile est dépliée afin de présenter à (B) une vue suffisante de l'intérieure de l'aile. Le site de ponction est la veine brachiale située le long de la jonction huméro-radiale. Le site de ponction est désinfecté avec une compresse d'alcool à 70%. Une aiguille stérile de petite dimension 27G est utilisée pour pratiquer une légère incision de la veine brachiale, la goutte de sang qui se forme à la surface de la peau est collectée à l'aide d'une micropipette préalablement réglée avec de volume de sang désiré (6µl/g) et munie d'un cône stérile par (C) (Smith et al., 2010; Wimsatt et al., 2005). Sous nos latitudes, les températures nocturnes peuvent parfois être relativement basse, l'utilisation d'une dalle chauffante de type vétérinaire (18-25°C) placée sous la chauve-souris peut

s'avérer utile afin de faciliter la vasodilatation et l'écoulement sanguin (Racey, Swift, & MacKie, 2011). L'échantillon est transféré dans un micro-tube de 0,2 ml de type Eppendorf « sec » et non hépariné, avant d'être placé par (C) dans un frigo (ou glacière) à +4°C pendant 8 à 12 heures pour centrifugation ultérieure (Médaille, Briend-Marchal, & Braun, 2005). La ponction terminée, un point de compression est immédiatement réalisé avec un morceau de coton, afin de faciliter l'hémostase, il est possible de stimuler une vasoconstriction par l'application légère d'un « Pack-Froid » adapté. La chauve-souris ne sera relâchée qu'après vérification de l'arrêt total du saignement, des mouvements de l'aile peuvent être simulés en cas de doute, ii) de sa bonne condition générale. Un apport de nourriture (vers de farine) pourra être envisagé pour éviter un choc hypoglycémique et de l'eau peu être présentée à la chauve-souris à l'aide d'une micropipette et d'un cône stérile afin de palier au risque de déshydratation (Racey et al., 2011). Le matériel usagé et souillé ayant servi à réaliser la prise de sang est évacué dans le conteneur prévu à cet usage.



Après les 8 à 12 heures de stockage à +4°C, le prélèvement sanguin est centrifugé afin de séparer le sérum. Une fois récupéré le sérum est ensuite conditionné dans un Eppendorf de 0,2 ml et archivé à -80°C. Le culot restant est également archivé à -80°C. Selon les cas, le sang total ou le culot peut être archivé dans du tampon de lyse pour des analyses ultérieures.



Dans le cadre d'une recherche de parasites sanguins sur des chauves-souris de moins de 9 grammes, la procédure de manipulation et de contention est similaire. La veine brachiale est « piquée » à l'aide d'une aiguille stérile 27G et un point de compression est immédiatement appliqué à l'aide de papier Whatman, à la fois pour récupérer l'échantillon sanguin ($< 0,2\%$ masse totale) et pour arrêter le saignement. La chauve-souris est relâchée dans les mêmes conditions de sécurité précédemment exposées et le matériel souillé évacué.

- *Prélèvements de peau :*

Chez les chiroptères, la membrane alaire (patagium) a un rôle vital dans le vol et les manœuvres aériennes, durant la poursuite des proies mais également lors de la phase de capture, car ils peuvent les encercler avec leurs ailes et/ou leur queue avant de s'en saisir par la bouche (Dale, 2003; Faure, Re, & Clare, 2009). Dans le milieu naturel les chauves-souris se déchirent ou perforent fréquemment une partie du patagium lors de collisions en vol (épines, barbelés...) mais également lors de contacts sociaux notamment pendant les périodes de reproduction (Davis, 1968). La cicatrisation rapide du patagium et son élasticité, permet de réaliser des biopsies de quelques millimètres de diamètre (4 à 8 mm) sans risque pour la survie de l'animal.

Les biopsies de peau sont régulièrement réalisées pour des analyses moléculaires ou des études génétiques. Elles sont effectuées le plus souvent au niveau du plagiopatagium (membrane alaire) pour des raisons de facilité d'accès et de faible vascularisation de la zone et parfois au niveau de l'uropatagium (membrane de la queue). Dans leur étude comparative sur la cicatrisation du patagium, suite à des biopsie de 4 et 8 millimètres de diamètres, Faure *et al.* (2009) montrent que i) la cicatrisation est bien plus rapide sur des biopsies de 4mm effectuées au niveau de l'uropatagium, car certainement mieux vascularisé, ii) la concentration en ADN est bien plus importante dans les tissus d'une biopsie effectuée sur l'uropatagium que dans ceux d'une biopsie de même taille, effectuée sur le plagiopatagium. Après 12 jours, la lésion est à 90% refermée. La vitesse de cicatrisation n'est pas influencée par les changements physiologiques importants survenant chez les femelles lors de la gestation ou de la lactation en comparaison avec des individus non-reproducteurs. Seule la diminution de l'activité entre été et hiver semble allonger le temps

de cicatrisation (Ceballos-Vasquez, Caldwell, & Faure, 2014).

Dans le cadre de notre projet, afin de réaliser les études génétiques nécessaires tout en minimisant notre impact sur les chauves-souris échantillonnées, nous avons décidé de réaliser des biopsies de 4 mm au niveau de l'uropatagium pour garantir une cicatrisation des plus rapides tout en ayant une quantité de matériel génétique suffisant. Nous avons donc choisi de modifier notre protocole initial sur les biopsies que nous avons appliqué lors de notre pré-étude en Guyane.

Pour réaliser la biopsie la présence de deux personnes (A et B) est requise. La chauve-souris est maintenue sur le dos (A), l'uropatagium est déplié et apposé sur un support prévu à cet effet afin de présenter à (B) une vue globale de la zone de prélèvement. La biopsie est réalisée par (B) à l'aide d'un « punch à biopsie » stérile et à usage unique. Le choix du site exact de biopsie est déterminé pour chaque individu en fonction du réseau de capillaires. En cas de saignement, un point de compression est effectué à l'aide d'une compresse. L'échantillon de peau est ensuite placé dans un Eppendorf de 1,5 ml d'alcool pur 96%, puis archivé.



- *Prélèvements de fèces et ectoparasites*

Avec l'avancée des différentes technologies comme le séquençage à haut débit, notamment utilisé en métagénomique, il nous semble intéressant de diversifier nos prélèvements de fèces. Outre les informations sur le régime alimentaire, combiner différentes approches peut-être une méthode complémentaire dans la caractérisation des agents infectieux présents chez un individu ou circulant dans des colonies mono- ou plurispécifiques (Bodewes et al., 2014; Donaldson et al., 2010). Ce type d'analyse nous permettrait également d'évaluer un mode d'excrétion virale en comparant les virus retrouvés dans les fèces et ceux présents chez l'individu échantillonné (sang). De même, lors des phases d'échantillonnage « habitat », cette technique d'analyse nous permettra d'évaluer la charge virale des différents gîtes utilisés ou non par les chauves-souris à un moment donné de leur cycle de vie.

Lors de la manipulation des individus (passage dans les sacs de contention, mesures biométriques, etc.), toute fèces excrétée par l'animal est prélevée avec une pince prévue uniquement à cet effet. L'échantillon est placé, soit dans un Eppendorf de 1,5 ml « sec » pour des analyses sur le régime alimentaire et conservé à température ambiante, soit dans un tampon de lyse adéquat pour la recherche de virus à ARN/ADN et de parasites. Dans ce dernier cas l'échantillon est conservé à +4°C. Concernant ce type de prélèvement il est très important de s'assurer de l'appartenance des fèces collectées à l'individu échantillonné et identifié, notamment pour la collecte dans les sacs de contention.

L'ensemble des fèces émises par les chauves-souris dans la gouttière du Harp-trap au moment de la

capture sera collecté dans des piluliers étanches et au volume adapté. Comme expliqué précédemment, un tampon de lyse sera ajouté et ces échantillons seront utilisés pour la recherche d'agents infectieux afin de tenter de déterminer une signature virale du gîte à un instant précis du cycle biologique des espèces.

Chez les parasites des chiroptères, la spécificité de l'hôte peut être le résultat d'une faible capacité de déplacement et de dispersion et/ou d'une longue co-évolution et co-adaptation (Giorgi et al., 2004; van Schaik et al., 2014). Comprendre les mécanismes reliant les parasites à leurs hôtes et leurs interactions est une information fondamentale en éco-épidémiologie, car elle permet d'évaluer les risques d'infections et de co-infection au sein des communautés.

Hématophages, ils contribuent très certainement à la propagation des agents infectieux entre espèces et au sein d'une même espèce (Dick & Patterson, 2006). L'échantillonnage des ectoparasites se fera par simple prélèvement à vue et le stockage se fera dans des tubes « secs » archivés à -80°C, ou dans de l'alcool pur, en fonction des analyses prévues.



- *Les prélèvements de poils*

Les prélèvements de poils seront utilisés pour l'analyse de marqueurs endogènes comme les hormones, notamment la testostérone, mais également pour l'analyse des isotopes stables (hydrogène, carbone, azote...) qui nous permettront ultérieurement de travailler sur les déplacements et la migration des individus (Hobson & Wassenaar, 2008; Wunder, 2012). Afin de répondre aux questionnements de ces travaux de recherche, il est important de bien appréhender le cycle de mue des espèces considérées et l'effet du turn-over des tissus concernés. En effet, les analyses isotopiques nous donnent des informations correspondant à la période de formation des tissus. Pour les tissus dont le métabolisme est inactif comme les poils, il est important de connaître le moment de leur pousse, chute ainsi que l'impact du sexe, de l'âge ou de la condition physique (Ethier, Kyle, Kyser, & Nocera, 2010; Fraser, Longstaffe, & Fenton, 2013).

Dans les zones tempérées, on constate une seule mue par an comparativement à d'autres mammifères. Chez une grande majorité d'espèces, la mue des chauves-souris commence durant l'été de façon asynchrone entre les sexes (Annexe 7). Par exemple, les mâles et les femelles non-reproductrices

entameront leur mue plus précocement que les femelles qui élèvent leurs jeunes. En effet, certains états physiologiques peuvent retarder ou bloquer la mue temporairement, stress nutritionnel ou reproduction, (Mo, Gili, & Ferrando, 2000). Certaines femelles comme la Grande noctule, et la Pipistrelle de Nathusius ne débiteront leur mue qu'après la mise bas et la lactation, d'autres comme les femelles de Minioptère de Schreibers (*Miniopterus shreibersii belpotis*) peuvent débiter leur mue avant la période de mise-bas et peuvent l'inhiber jusqu'à la fin de la lactation pour diminuer le surcoût énergétique (Dwyer, 1963; Ilyin, 1990). Pour les chiroptères de zones tempérées, la mue débute généralement par le dos, puis le ventre (Annexe 8), la progression peut varier d'une espèce à l'autre et des différences intraspécifiques peuvent être constatées (sexe, âge, condition physiques...) (Fraser et al., 2013).

Les prélèvements de poils seront réalisés à la base du dos en suivant les recommandations de Fraiser et al. (2013). Quelques touffes de poils avec leurs bulbes seront délicatement arrachées avec les doigts et placées sur un bout de scotch qui sera archivé dans un tube « sec » de 2 ml préalablement rempli de dessicant de type « Silicagel », afin de garantir leur conservation. Les bulbes sont indispensables pour la réalisation des dosages hormonaux et pourront également être utilisés pour des analyses ADN complémentaires. Les poils coupés à la base de la peau ne suffisant pas, cette méthode n'est pas conseillée sur des animaux vivants car couper une partie de la fourrure ne stimule pas la repousse des poils et peut donc engendrer une dépense énergétique (thermorégulation) sur une plus longue période.



- *Marquage individuel par transpondeurs*

Le marquage individuel par transpondeur est une technique utilisée depuis le milieu des années 1980 chez un grand nombre d'espèces de poissons, reptiles, amphibiens, oiseaux, invertébrés et mammifères (Gibbons & Andrews, 2004). De nombreuses études montrent que cette technologie n'entraîne pas d'impact négatif sur les individus et ne diminue pas le taux de survie chez les chiroptères (Neubaum, Neubaum, Ellison, & O'Shea, 2005; Rigby, 2012) et serait plus avantageuse en termes de recapture, que d'autres techniques de marquage pour estimer les taux de survie, par le biais d'antennes fixes par exemple (Ellison et al., 2007). Dans le cadre de notre projet à long terme, il nous semble intéressant de cibler des juvéniles volants de l'année.

Dans un premier temps, le marquage pourra concerner uniquement les femelles et l'ensemble des juvéniles de Minioptère de Schreibers qui seront capturés sur des sites adaptés en adéquation avec les acteurs locaux et sur la période de mi-juillet à mi-août. Avec l'avancement de notre étude, en fonction des questionnements scientifiques régionaux et en coordination avec les chiroptérologues locaux, d'autres espèces cavernicoles pourront être concernées : Grand et Petit-Murin (*Myotis myotis* et *Myotis blythii*), Grand Rhinolophe (*Rhinolophus ferrumequinum*). Cela nous permettra d'apporter d'autres éléments de réponse à notre étude tout en approfondissant les connaissances locales sur les déplacements populationnels notamment en ce qui concerne la dispersion des essaims hivernaux sur d'autres sites estivaux pour la mise bas. Par la recapture, le marquage nous permettra d'identifier des individus d'âge connu et d'évaluer l'évolution de leur charge virale au cours du temps. La pose de transpondeur nous fournira des informations non seulement au niveau des individus mais aussi de la population et de la communauté, notamment en termes de dynamique spatiale et temporelle. D'un point de vue conservation, cette technique utilisée à moyen et long terme, nous permettra d'avoir une idée de la dispersion et d'obtenir des informations sur les échanges et la fidélité aux gîtes (hivernage, parturition, transit voire migration). Selon les espèces, ces informations pourront être utilisées pour mettre en évidence et hiérarchiser l'importance des sites pour leur conservation. Selon la configuration des gîtes suivis et des financements à venir, une étude annexe pourra être mise en place afin d'évaluer l'impact lié à la pose de transpondeurs, notamment grâce à l'installation d'équipement de suivi individuel (antenne de détection pour la fréquentation et balance électronique pour le suivi de la masse).

Dans une optique d'harmonisation des techniques et du matériel utilisé à l'échelle nationale, notre programme de marquage sera mis en place en adéquation avec les recommandations du MNHN et en se basant sur les programmes actuellement en place, comme en Bretagne, avec le suivi de colonies de Grand murin (*Myotis myotis*) (Farcy O, 2012). Dans le cadre de notre étude chaque individu sera transpondé à l'aide d'une seringue à usage unique. Après avoir désinfecté la zone d'insertion de l'aiguille, la peau du dos est délicatement relevée pour former un « triangle » et le transpondeur est injecté sous la peau.



Annexe 1 : Liste des espèces de chiroptères en France métropolitaine

ESPECE EN FRANCE METROPOLITAINE	Liste rouge UICN France	Directives Habitats-Faune-Flore
<u>Minioptéridés</u>		
Minioptère de Schreibers <i>Miniopterus schreibersii</i>	VU	Annexe 2 & 4
<u>Molossidés</u>		
Molosse de Cestoni <i>Tadarida teniotis</i>	LC	Annexe 4
<u>Rhinolophidés</u>		
Petit Rhinolophe <i>Rhinolophus hipposideros</i>	LC	Annexe 2 & 4
Grand Rhinolophe <i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	NT	Annexe 2 & 4
Rhinolophe euryale <i>Rhinolophus euryale</i>	NT	Annexe 2 & 4
Rhinolophe de Méhely <i>Rhinolophus mehelyi</i>	CR	Annexe 2 & 4
<u>Vespertilionidés</u>		
Barbastelle d'Europe <i>Barbastella barbastellus</i>	LC	Annexe 2 & 4
Grand Murin <i>Myotis myotis</i>	LC	Annexe 2 & 4
Grande Noctule/Noctule géante <i>Nyctalus lasiopterus</i>	DD	Annexe 4
Murin à moustaches <i>Myotis mystacinus</i>	LC	Annexe 4
Murin à oreilles échancrées <i>Myotis emarginatus</i>	LC	Annexe 2 & 4
Murin d'Alcathoe <i>Myotis alcathoe</i>	LC	Annexe 4
Murin d'Escaleraï <i>Myotis escaleraï</i>	DD	Annexe 4
Murin de Bechstein <i>Myotis bechsteinii</i>	NT	Annexe 2 & 4
Murin de Brandt <i>Myotis brandtii</i>	LC	Annexe 4
Murin de Capaccini <i>Myotis capaccinii</i>	VU	Annexe 2 & 4
Murin de Daubenton <i>Myotis daubentonii</i>	LC	Annexe 4
Murin de Natterer <i>Myotis nattereri</i>	LC	Annexe 4
Murin des marais <i>Myotis dasycneme</i>	NA	Annexe 2 & 4
Murin du Maghreb <i>Myotis punicus</i>	VU	Annexe 4
Murin spA <i>Myotis spA</i>	Non défini	Non défini
Noctule commune <i>Nyctalus noctula</i>	NT	Annexe 4
Noctule de Leisler <i>Nyctalus leisleri</i>	NT	Annexe 4
Oreillard gris/Oreillard méridional <i>Plecotus austriacus</i>	LC	Annexe 4
Oreillard montagnard <i>Plecotus macrobullaris</i>	DD	Annexe 4
Oreillard roux <i>Plecotus auritus</i>	LC	Annexe 4
Petit Murin <i>Myotis blythii</i>	NT	Annexe 2 & 4
Pipistrelle commune <i>Pipistrellus pipistrellus</i>	LC	Annexe 4
Pipistrelle de Kuhl <i>Pipistrellus kuhlii</i>	LC	Annexe 4
Pipistrelle de Nathusius <i>Pipistrellus nathusii</i>	NT	Annexe 4
Pipistrelle pygmée/Pipistrelle soprane <i>Pipistrellus pygmaeus</i>	LC	Annexe 4
Sérotine bicolore/Vespertilion bicolore <i>Vespertilio murinus</i>	DD	Annexe 4
Sérotine commune <i>Eptesicus serotinus</i>	LC	Annexe 4
Sérotine de Nilsson/Sérotine boréale <i>Eptesicus nilssonii</i>	LC	Annexe 4
Vespère de Savi <i>Hypsugo savii</i>	LC	Annexe 4

Annexe 2 : Charte de déontologie pour la pratique de la capture des chiroptères

Charte de déontologie pour la pratique de la capture des chiroptères

La capture des chiroptères est une pratique à risque pour les chiroptères et les chiroptérologues, **elle nécessite une dérogation à l'interdiction de capture d'espèces protégées**. Ainsi, il est fondamental que toute personne exerçant cette technique s'engage à respecter les points suivants :

1. Toute session de capture de chiroptères doit se faire dans une démarche scientifique valable et reconnue, selon un protocole bien construit et réfléchi, dans un but de recherche, de protection et/ou de conservation ; La capture d'animaux en léthargie ou dans un but de sensibilisation du Grand public n'est donc pas tolérée ;
2. Toute session de capture doit être l'aboutissement d'un processus de réflexion qui justifie sa nécessité absolue, après avoir éliminé les autres moyens d'étude moins invasifs (détection acoustique, suivi des cavités...) et vérifié sa stricte nécessité au regard des connaissances préalablement disponibles sur le statut de l'espèce, au niveau local ou national ;
3. Toute session de capture doit se faire dans des conditions de sécurité optimales ; chaque chiroptérologue doit avoir pris connaissance des risques sanitaires encourus lors de la manipulation de chauves-souris, et plus particulièrement de l'exposition au virus de la rage, et de toutes les mesures de protection et d'hygiène à prendre afin d'éviter toute contamination, pour le bien-être des manipulateurs et celui des animaux manipulés ;
4. Avant toute session de capture, il est indispensable :
 - de disposer des dérogations préfectorales et autorisations nécessaires (propriétaire) ;
 - de s'assurer que la zone n'a pas fait l'objet de captures récentes ;
 - de prospecter la zone afin d'évaluer les risques pour les chiroptérologues et les chiroptères, et d'ajuster son protocole ;
 - de s'assurer que les conditions sont favorables (période, météo, moyens humains et matériel...) ;
 - Aucune opération de capture ne doit compromettre la vie ou la santé des individus étudiés ;
5. Le poste puis le dispositif de capture doivent être méticuleusement installés, de jour, de manière fonctionnelle, en fonction du milieu et des moyens disponibles, et en limitant l'impact sur le milieu ;
6. Avant de tendre les filets, chaque chiroptérologue doit être opérationnel et doit avoir sur lui en permanence des gants, deux lampes, plusieurs sacs de contention propres et une paire de ciseaux ;
7. Afin de limiter au maximum la capture d'oiseaux, le dispositif doit être tendu juste après le coucher du soleil ;
8. Au cours de toute capture, il est indispensable d'informer et de bien encadrer son équipe pour minimiser le dérangement (bruit, lumière, circulation) et s'assurer du bon déroulement de la session ;
9. Le dispositif doit être scrupuleusement vérifié en fonction de la densité de capture, au maximum toutes les 10 minutes et ne doit jamais rester sans surveillance ; en cas de besoin, une mise en berne doit être effectuée ;
10. A chaque capture, il est indispensable de bien cerner la situation (nombre de chauves-souris, niveau de difficultés, priorités) avant de commencer à démailler afin de repérer les espèces et individus à démailler en priorité ;
11. Le port de gants est fortement conseillé, il est indispensable pour la manipulation des espèces dites de gros gabarit* ;

12. Le démaillage des chiroptères du filet doit être effectué très délicatement mais rapidement (3 minutes maximum); en cas de difficultés, le filet doit être découpé aux ciseaux pour libérer l'individu au plus vite ;
13. En cas de captures involontaires d'autres animaux (insectes, oiseaux, mammifères...), le démaillage doit être effectué rapidement, en toute sécurité pour le manipulateur et pour l'animal dans la mesure du possible ;
14. Chaque chauve-souris capturée doit être mise immédiatement dans un sac de contention en attendant d'être manipulée ; les sacs (vides ou non) doivent être systématiquement suspendus, visibles et mis à l'abri en cas d'intempéries ; le temps de contention doit être le plus court possible ;
15. La manipulation pour l'identification et le relevé de données doit se faire délicatement et rapidement, en toute sécurité pour l'individu et le chiroptérologue, et en priorité pour les espèces sensibles et les femelles gestantes ou lactantes ;
16. Le relâcher doit se faire sur la zone de capture, immédiatement après la manipulation, en laissant la chauve-souris s'envoler de son plein gré ; Il est nécessaire de vérifier l'aptitude de l'animal à être relâché et de s'assurer de son bon envol ;
17. Le démontage du dispositif doit être effectué scrupuleusement, en commençant par la vérification des filets, leur démontage puis le rangement du poste ; chaque sac de contention devra être vérifié ;
18. Toutes les données récoltées lors d'une session de capture doivent faire l'objet d'une saisie informatique et d'une valorisation ;
19. Les données (partielles ou en totalité) doivent être communiquées au groupe chiroptère régional afin de les informer que la zone a été prospectée ;
20. Un compte-rendu annuel des activités de capture doit être obligatoirement transmis à la DREAL de la région concernée et à la DREAL Franche-Comté.

*Espèces dites de gros gabarit : Grand Rhinolophe (*Rhinolophus ferrumequinum*), Rhinolophe euryale (*Rhinolophus euryale*), Rhinolophe de Méhely (*Rhinolophus mehelyi*), Molosse de Cestoni (*Tadarida teniotis*), Sérotine commune (*Eptesicus serotinus*), Sérotine de Nilsson (*Eptesicus nilssonii*), Sérotine bicolore (*Vespertilio murinus*), Grande Noctule (*Nyctalus lasiopterus*), Noctule de Leisler (*Nyctalus leisleri*), Noctule commune (*Nyctalus noctula*), Petit Murin (*Myotis blythii*), Grand Murin (*Myotis myotis*), Murin du Maghreb (*Myotis punicus*).



**Muséum
national
d'Histoire
naturelle**

Groupes
Chiroptères
Régionaux



Groupe de travail « capture » PNAC (2009/2013),
MNHN, Groupe Chiroptère National, SFPEM, FCEN



Annexe 3 : Listing des métadonnées

Données de session	Données de capture	Données de prélèvement
Date	Heure_capture	N° Prélèvement
Coordinateur	N° Capture	Sang
Objectif_étude	N° Transpondeur	Patagium
Commune	Recapture	Poils
Site	Taxon	Fèces
Latitude	Sexe	Urine
Longitude	Av_Bras	Parasites
Altitude	D5	P_Watman
Habitats	D3	Photos
Heure_ouverture	Pouce	Sons
Heure_fermeture	Queue	Rmq_prélèvements
FJ	Tibia	
HT	Pied	
Heure_MeB	CM3	
FJ	Masse	
HT	Testicules	
Rmq_sessions	Epididimes	
	Tunique_vag.	
	Mamelles	
	Epiphyses	
	Rmq_captures	

Annexe 4 : Référentiel pour la saisie des données

Données de sessions

- Date = jour d'ouverture des dispositifs de capture
- Latitude/Longitude = coordonnées GPS en UTM
- Objectif de l'étude = thème de la session : inventaire, formation, prélèvement...
- Heure_Ouvert. : heure de mise en action des dispositifs de capture = début session
- Heure_Fermet. : heure de démontage définitif des dispositifs de capture = fin de session
- Heure_MeB : noter l'heure si mise en berne des dispositifs (partiel ou total) et la surface concernée de FJ et/ou HT
 - si pas de réouverture = noter l'heure de démontage définitif des dispositifs dans la colonne "Heure_Fermet." = fin de session
 - si réouverture = noter à nouveau l'heure de mise en action des dispositifs dans la colonne "Heure_Ouvert." et la surface concernée de FJ et/ou HT
- FJ : surface de filets Japonnais en m2
- HT: surface de Harp-Trap en m2

Données de captures

Ensemble des données récoltées en fonction des recommandations du "Cahier Technique pour l'Identification des Chiroptères" MNHN

- N° de capture : unique et continu dans la base de donnée
- Taxon : nom latin
- Ensemble de la biométrie en mm
- Masse en gramme

Données de prélèvements

- N° de prélèvement : code alpha-numérique = " initiales du site-n°capture " (ex: LDX001 = prélèvement à Lindus sur capture n°1)
- Sang : capillaire non-hépariné, conservation +4°C avant centrifugation
- Poils : arracher avec bulbe, conservation à sec, t° ambiante
- Fécès : conservation à sec, t° ambiante
- Ecouvillons : en fonction des objectifs (si nécessaire)
- Parasites : en fonction des objectifs
- P. Watman : faire sécher et conserver à sec
- Photos d'un individu : identifier les clichés du même individu avec le numéro unique d'échantillon, les archiver dans un dossier de session (Photos-Date-Site)
- Sons d'un individu : identifier les enregistrements



Annexe 5 : Tableau des mesures biométriques

ESPECE	ESPECE	AB	D5	D3	Phalanges D4.1 D4.2	Tibia	Pouce	CM3	Pied	Queue	Poids
		Pied coulisse	à Règlet butée	à Règlet à butée	Pied coulisse	à Pied coulisse	Pied coulisse	à Pied coulisse	Pied coulisse	à Règlet	Peson ou balance
Petit Rhinolophe	<i>Rhinolophus hipposideros</i>										
Grand Rhinolophe	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	systématique	facultatif								
Rhinolophe euryale	<i>Rhinolophus euryale</i>										
Rhinolophe de Mehely	<i>Rhinolophus mehelyi</i>										
Rhinolophe de Blasius	<i>Rhinolophus blasii</i>										
Grand Murin	<i>Myotis myotis</i>										
Petit Murin	<i>Myotis blythii</i>										
Murin du Maghreb	<i>Myotis punicus</i>										
Murin de Bechstein	<i>Myotis bechsteinii</i>										
Murin de Natterer	<i>Myotis nattereri</i>										
Murin d'Escalera	<i>Myotis escaleraei</i>										
Murin spA	<i>Myotis sp.A</i>										
Murin de Daubenton	<i>Myotis daubentonii</i>										
Murin de Capaccini	<i>Myotis capaccinii</i>										
Murin des marais	<i>Myotis dasycneme</i>										
Murin à oreilles échanquées	<i>Myotis emarginatus</i>										
Murin à moustaches	<i>Myotis mystacinus</i>										
Murin d'Alcathoe	<i>Myotis alcathoe</i>										
Murin de Brandt	<i>Myotis brandtii</i>										
Minioptère de Schreibers	<i>Miniopterus schreibersii</i>										
Molosse de Cestoni	<i>Tadarida teniotis</i>										
Grande Noctule/Noctule géante	<i>Nyctalus lasiopterus</i>										
Noctule commune	<i>Nyctalus noctula</i>										
Noctule de Leisler	<i>Nyctalus leisleri</i>										
Sérotine commune	<i>Eptesicus serotinus</i>										
Sérotine de Nilsson/Sérotine boréale	<i>Eptesicus nilssonii</i>										
Sérotine bicolore/Vespertilion bicolore	<i>Vespertilio murinus</i>										
Vespère de Savi	<i>Hypsugo savii</i>										
Pipistrelle commune	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>										
Pipistrelle pygmée/Pipistrelle soprane	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>										
Pipistrelle de Kuhl	<i>Pipistrellus kuhlii</i>										
Pipistrelle de Nathusius	<i>Pipistrellus nathusii</i>										
Barbastelle d'Europe	<i>Barbastella barbastellus</i>										
Oreillard roux	<i>Plecotus auritus</i>										
Oreillard montagnard	<i>Plecotus macrotis</i>										
Oreillard gris/Oreillard méridional	<i>Plecotus austriacus</i>										

Groupe de travail « capture » PNAC (2009/2013),
MNHN, Groupe Chiroptère National, SFEPM, FCEN



Annexe 6 : CLASSIFICATION DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES SELON LEUR DEGRÉ DE GRAVITÉ

Le degré de gravité d'une procédure expérimentale est déterminé en fonction de l'intensité de la douleur, de la souffrance, de l'angoisse ou du dommage durable qu'un animal donné risque de subir au cours de la procédure expérimentale.

Les classes de gravité ci-dessous ainsi que les critères de classification sont extraits de l'annexe de l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales. Pour plus d'informations, consulter :

<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027038013&dateTexte=&categorieLien=id>

Classes de gravité

Sans réveil : Les procédures expérimentales menées intégralement sous anesthésie générale, au terme desquelles l'animal ne reprend pas conscience, relèvent de la classe « sans réveil ».

Légère : Les procédures expérimentales en raison desquelles les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse légère de courte durée ainsi que celles sans incidence significative sur le bien-être ou l'état général des animaux relèvent de la classe « légère ».

Modérée : Les procédures expérimentales en raison desquelles les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse modérée de courte durée ou une douleur, une souffrance ou une angoisse légère de longue durée ainsi que celles susceptibles d'avoir une incidence modérée sur le bien-être ou l'état général des animaux relèvent de la classe « modérée ».

Sévère : Les procédures expérimentales en raison desquelles les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse intense ou une douleur, une souffrance ou une angoisse modérée de longue durée ainsi que celles susceptibles d'avoir une incidence grave sur le bien-être ou l'état général des animaux relèvent de la classe « sévère ».

Critères de classification

La détermination d'une classe de gravité tient compte de toute intervention ou manipulation concernant l'animal dans le cadre d'une procédure expérimentale donnée (type de manipulation, nature et intensité de la douleur, de la souffrance, de l'angoisse ou du dommage durable causé, durée, fréquence et multiplicité des techniques utilisées).

Cette classe de gravité est fondée sur les effets les plus graves que risque de subir l'animal après mise en œuvre de toutes les mesures de raffinements appropriés. D'autres facteurs additionnels sont également pris en compte :

- type d'espèce et du génotype ;
- stade de développement, âge et sexe de l'animal ;
- niveau d'apprentissage de la procédure expérimentale atteint par l'animal ;
- si l'animal est réutilisé, gravité réelle des procédures expérimentales antérieures ;
- méthodes utilisées pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse, y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins ;
- points limites adaptés.

Exemples non exhaustifs de différents types de procédures expérimentales définies selon chaque classe de gravité sur la base de facteurs liés au type de procédure expérimentale

1. Légère :

- a) Anesthésie, sauf si elle est exclusivement destinée à la mise à mort ;
- b) Etude pharmacocinétique ou traitement dans laquelle une dose unique est administrée, et la substance n'est pas censée avoir d'effet négatif détectable ;
- c) Prélèvement d'un nombre restreint d'échantillons sanguins avec un volume total prélevé < 10 % du volume sanguin de l'animal (soient au total < 200 ml/souris de 25 g) (voir Tab.2 ci-après)
- d) Imagerie non invasive (par exemple: échographie, fluorescence 3D, chimiluminescence) avec sédation ou anesthésie appropriée ;
- e) Procédures expérimentales superficielles, par exemple biopsies de l'oreille et de la queue, implantation sous-cutanée non chirurgicale de pompes miniatures et transpondeurs ;
- f) Utilisation d'appareils externes de télémétrie (prise de température, test de glycémie, etc.) qui n'entraînent que des troubles mineurs chez l'animal ou qui n'ont qu'une incidence mineure sur son activité normale et son comportement normal ;



- g) Administration d'une substance par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intrapéritonéale, par gavage et par voie intraveineuse via les vaisseaux sanguins superficiels, lorsque la substance n'a qu'une incidence légère sur l'animal et lorsque les volumes administrés sont dans des limites appropriées à la taille et à l'espèce de l'animal (voir Tab. 3 ci-après) ;
- h) Induction de tumeurs par injection de lignées tumorales ou tumeurs spontanées qui n'ont pas d'effet clinique négatif détectable (par exemple, tumeur sous-cutanée ou intramammaire non métastatique de taille <17mm en absence de nécrose et de gène pour la locomotion de l'animal) ;
- i) Implantation chirurgicale sous cutanée sous anesthésie générale et analgésie appropriée de fragment de tumeur (modèle tumoral non métastatique) ;
- j) Elevage d'animaux génétiquement modifiés dans le but d'obtenir un phénotype ayant des effets légers (phénotype non dommageable) ;
- k) Régime alimentaire modifié qui ne répond pas à tous les besoins nutritionnels de l'animal et est susceptible d'entraîner une anomalie clinique légère pendant la période couverte par l'étude ;
- l) Jeûne forcé pendant moins de vingt-quatre heures chez la souris ou le rat adulte ;
- m) Etudes comportant, pendant une courte durée, la privation de congénères pour des espèces socialement développées et l'isolement en cage individuelle pour les rats ou les souris adultes.

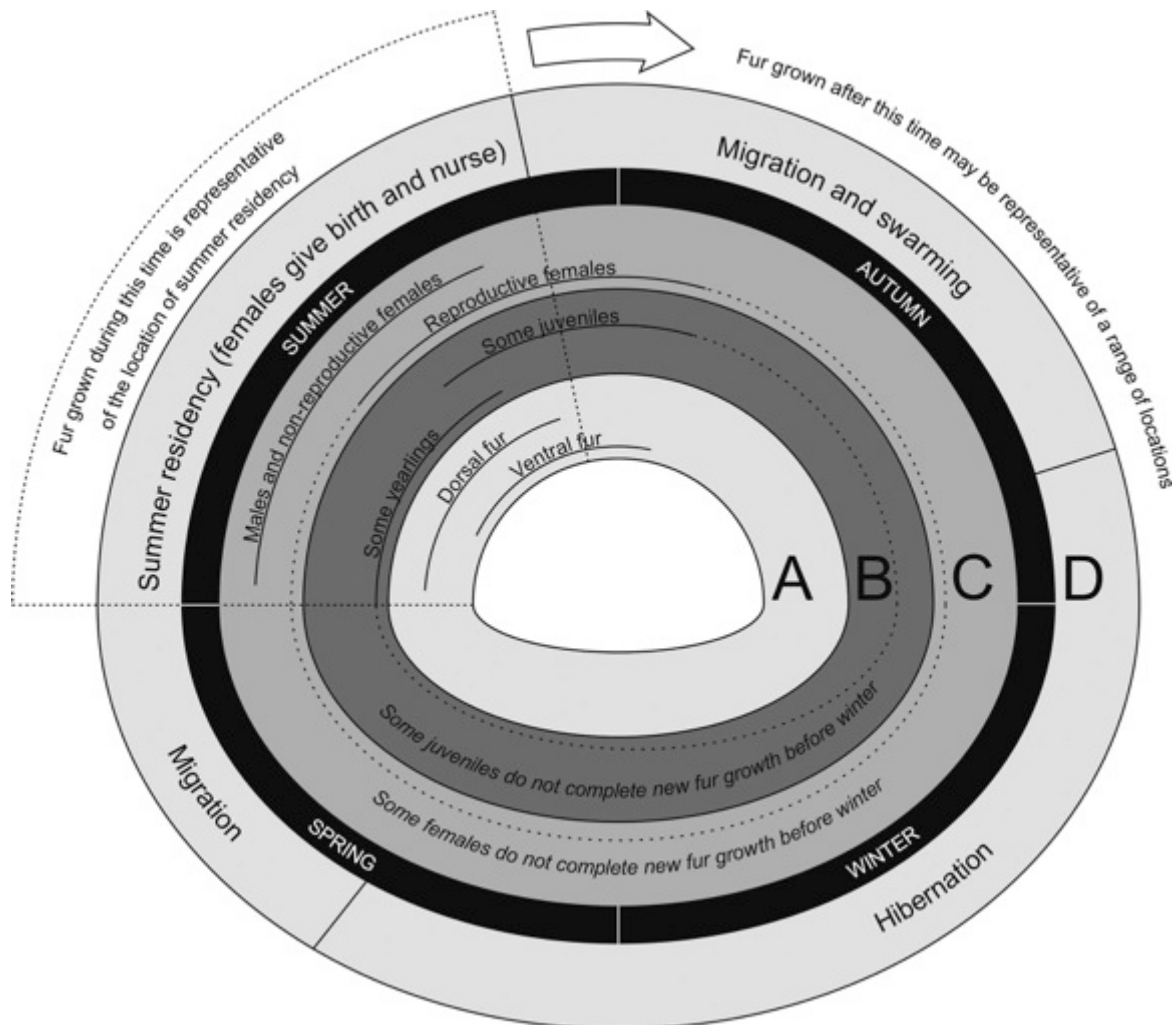
2. Modérée :

- a) Application fréquente de substances d'essai produisant des effets cliniques modérés ;
- b) Prélèvements d'échantillons sanguins multiples avec période de récupération adaptée (voir Tab. 1 ci-après : pour une souris de 25g : 100ml/semaine ; 200ml/15 jours) ;
- c) Etudes de détermination des plages de concentrations présentant une toxicité aiguë, essais de toxicité chronique/de cancérogénicité, dont le point limite n'est pas la mort ;
- d) Chirurgie sous anesthésie générale et analgésie appropriée, associée à une douleur ou une souffrance postopératoire ou à un trouble de l'état général. Exemples : thoracotomie, craniotomie, laparotomie, orchidectomie, implantation de dispositifs biomédicaux (par exemple, émetteurs télémétriques, pompes miniatures, etc.) ;
- e) Modèles pour l'induction de tumeurs ou tumeurs spontanées susceptibles de causer une douleur ou une angoisse modérée ou d'avoir une incidence modérée sur le comportement normal (par exemple tumeur pulmonaire sans perte de poids >20%, en absence de difficulté respiratoire et en absence de signes de gêne et de douleur (poils hérissés, prostration) (voir signes indicateurs de douleur ci-après) ;
- f) Irradiation ou chimiothérapie avec une dose sublétales ou une dose normalement létale mais avec reconstitution du système immunitaire. Les effets négatifs escomptés devraient être légers ou modérés et de courte durée (< 5 jours) ;
- g) Elevage d'animaux génétiquement modifiés dans le but d'obtenir un phénotype dommageable ayant des effets modérés (tumeurs spontanées sous cutanées ou mammaires non métastatiques) ;
- h) Création d'animaux génétiquement modifiés par des procédures expérimentales chirurgicales ;
- i) Etudes impliquant un régime alimentaire modifié qui ne répond pas à tous les besoins nutritionnels de l'animal et est susceptible d'entraîner une anomalie clinique modérée pendant la période couverte par l'étude ; j) Jeûne forcé pendant quarante-huit heures chez la souris ou le rat adulte ;
- k) Déclenchement de réactions de fuite ou d'évitement alors que l'animal n'est pas en mesure de s'échapper ou d'éviter le stimulus, susceptibles de causer une angoisse modérée.

3. Sévère :

- a) Essais de toxicité dont le point limite est la mort ou susceptibles d'entraîner la mort et de causer des états pathologiques graves. Par exemple, essai de toxicité aiguë au moyen d'une dose unique (voir OCDE, lignes directrices pour les essais) ;
- b) Essai d'activité d'un vaccin caractérisé par un trouble persistant de l'état général de l'animal, une maladie progressive mortelle, associés à une douleur, une angoisse ou une souffrance modérée de longue durée ;
- c) Irradiation ou chimiothérapie avec une dose létale sans reconstitution du système immunitaire ou avec reconstitution et déclenchement d'une maladie induite par le rejet de la greffe ;
- d) Modèles avec induction de tumeurs ou avec tumeurs spontanées susceptibles de provoquer une maladie progressive mortelle associée à une douleur, une angoisse ou une souffrance modérée de longue durée. Par exemple: tumeurs invasives et métastatiques (osseuse, pulmonaire, intracérébrale, hépatique, pancréatique, du colon) entraînant une cachexie (>20% de perte de poids), une difficulté respiratoire, des troubles du comportement (difficulté de locomotion, absence de toilettage, prostration), développement d'ascite ;
- e) Interventions chirurgicales ou autres sous anesthésie générale, susceptibles de causer une douleur, une souffrance ou une angoisse postopératoire intense ou modérée et persistante et un trouble persistant de l'état général de l'animal. Fractures instables provoquées, thoracotomie sans analgésie appropriée ou traumatisme visant à entraîner une défaillance multiple d'organes ;
- f) Elevage d'animaux atteints de troubles génétiques, susceptibles de présenter un trouble grave et persistant de l'état général, par exemple, maladie de Huntington, dystrophie musculaire, névrite chronique récurrente (phénotype dommageable ayant des effets sévères) ;
- g) Test de la nage forcée ou de l'exercice forcé dont le point limite est l'épuisement.

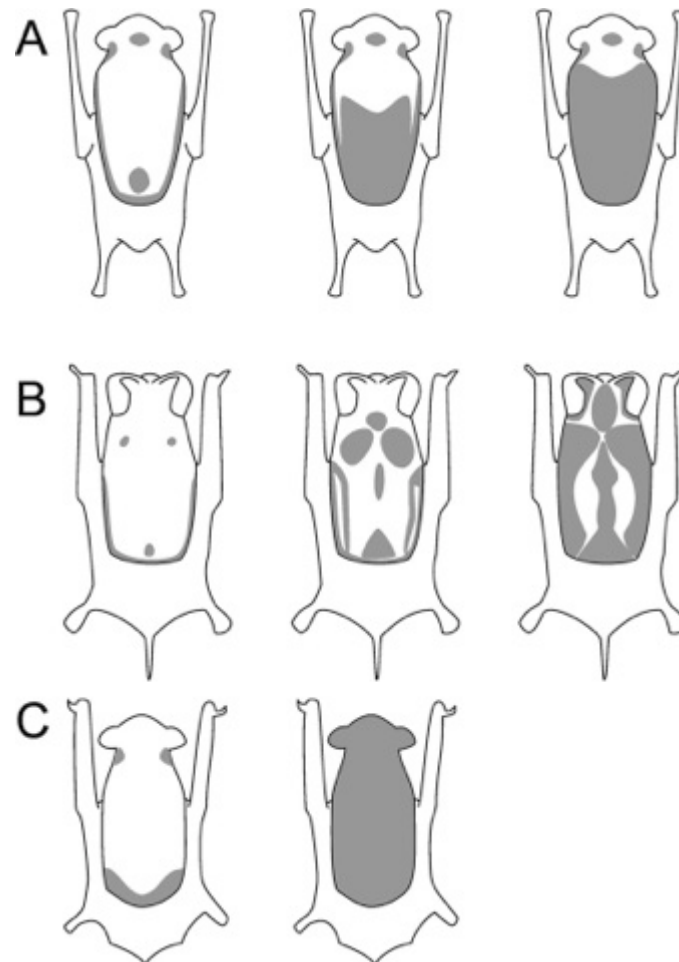
Annexe 7 : Modèle conceptuel du cycle de mue chez les chiroptères de zones tempérées



“Variation in the timing of new fur growth relating to (A) moult progression, (B) age, and (C) sex and (or) reproductive status may overlap with (D) relevant annual life-history events such as fall migration and (or) hibernation. Such overlap will decrease the extent to which new fur growth is completed at the location where the bat spent the summer season. Based on general trends reported in the literature, fur samples taken dorsally from adult males are most likely to have grown earlier in the summer season and thus be reflective of the location of summer residency”.

Figure : (Fraser et al., 2013)

Annexe 8 : Exemples de progressions de mues



“Patterns of within-individual new fur growth (moult progression) vary substantially among species. Three examples of the variable moult progressions that have been documented in bats include (A) a cephalad progression in Schreiber’s long-fingered bats (*Miniopterus schreibersii blepotis*) (modified from Dwyer 1963, reproduced with permission of Aust. J. Zool., Vol. 11, Issue 3, pp. 292, © 1963 CSIRO Publishing), (B) a progression in patches in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) (modified from Constantine 1957, reproduced with permission of J. Mammal., Vol. 38, Issue 4, pp. 462, © 1957 Allen Press Publishing Services), and (C) diffuse new fur growth in 1-year-old female eastern water bats (*Myotis petax*) (modified from Tiunov and Makarikova 2007, reproduced with permission of Acta Chiropterol., Vol. 9, Issue 2, pp. 540, © 2007 Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences). All figures illustrate the dorsal aspect with time passing from left to right. New fur is illustrated by the shaded regions”.

Figure : (Fraser et al., 2013)

Bibliographie

- Albayrak, I., & Coskun, S. (2000). Geographic variations and taxonomic status of *Miniopterus schreibersi* (Kuhl, 1819) in Turkey (Chiroptera: Vespertilionidae). *Turkish Journal of Zoology*, 24(2), 125-134.
- Altringham, J. D. (2011). *Bats: from evolution to conservation*: Oxford University Press.
- Angell, R. L., Butlin, R. K., & Altringham, J. D. (2013). Sexual segregation and flexible mating patterns in temperate bats. *PLoS ONE*, 8(1), e54194.
- Angell, R. L., Butlin, R. K., & Altringham, J. D. (2013). Sexual segregation and flexible mating patterns in temperate bats. *PLoS ONE*, 8(1), e54194-e54194. doi: 10.1371/journal.pone.0054194
- Badrane, H., & Tordo, N. (2001). Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *Journal of virology*, 75(17), 8096-8104.
- Barton, E. S., White, D. W., Cathelyn, J. S., Brett-McClellan, K. A., Engle, M., Diamond, M. S., . . . Virgin, H. W. t. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*, 447(7142), 326-329.
- Bartonicka, T., & Gaisler, J. (2007). Seasonal dynamics in the numbers of parasitic bugs (Heteroptera, Cimicidae): a possible cause of roost switching in bats (Chiroptera, Vespertilionidae). *Parasitology research*(6), 1323.
- Bartonicka, T., & Ruzickova, L. (2012). Bat bugs (*Cimex pipistrelli*) and their impact on non-dwelling bats. *Parasitology research*(3), 1233.
- Benda, P., Ivanova, T., Horáček, I., Hanák, V., Červený, J., Gaisler, J., . . . Vohralík, V. (2003). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the eastern Mediterranean. Part 3. Review of bat distribution in Bulgaria. *Acta Soc. Zool. Bohem*, 67(4), 245-357.
- Betke, M., Hirsh, D. E., Makris, N. C., McCracken, G. F., Procopio, M., Hristov, N. I., . . . Kunz, T. H. (2008). THERMAL IMAGING REVEALS SIGNIFICANTLY SMALLER BRAZILIAN FREE-TAILED BAT COLONIES THAN PREVIOUSLY ESTIMATED. *Journal of Mammalogy*, 89(1), 18-24.
- Blehert, D. S. (2012). Fungal Disease and the Developing Story of Bat White-nose Syndrome. *PLoS Pathogens*, 8(7), e1002779. doi: 10.1371/journal.ppat.1002779
- Bllgln, R., Karatas, A., Coraman, E., Pandurski, I., Papadatou, E., & Morales, J. C. (2006). Molecular taxonomy and phylogeography of *Miniopterus schreibersi* (Kuhl, 1817) (Chiroptera: Vespertilionidae), in the Eurasian transition. *Biological Journal of the Linnean Society*(4), 577. doi: 10.1111/j.1095-8312.2006.00591.x

- Bodewes, R., Ruiz-Gonzalez, A., Schapendonk, C. M. E., van den Brand, J. M. A., Osterhaus, A. D. M. E., & Smits, S. L. (2014). Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. *Virology Journal*, 11, 89-89. doi: 10.1186/1743-422X-11-89
- Bogdanowicz, W., Piksa, K., & Tereba, A. (2012). Genetic structure in three species of whiskered bats (genus *Myotis*) during swarming. *Journal of Mammalogy*, 93(3), 799-807. doi: 10.1644/11-MAMM-A-180.3
- Bruyndonckx, N., Dubey, S., Ruedi, M., & Christe, P. (2009). Molecular cophylogenetic relationships between European bats and their ectoparasitic mites (Acari, Spinturnicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51(2), 227-237. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2009.02.005>
- Calisher CH, C. J., Field HE, Holmes KV, Schountz T. (2006). Bats: Important reservoir hosts of emerging disease. *Clinical Microb. Rev.* 19(3) : 531-545.
- Ceballos-Vasquez, A., Caldwell, J. R., & Faure, P. A. (2014). Seasonal and reproductive effects on wound healing in the flight membranes of captive big brown bats. *Biology open*, 4(1), 95-103.
- Charles-Dominique P., B. A., Jouard S. (2001). Les chauves-souris de Guyane. *Publications scientifiques du Muséum national d'histoire naturelle*.
- Dale, M. J. (2003). Lignes directrices du CCPA sur: les procédures sur les animaux d'expérimentation—lignes directrices adoptées sur l'euthanasie.
- Davis, R. (1968). Wing defects in a population of pallid bats. *American Midland Naturalist*, 388-395.
- Dick, C. W., & Patterson, B. D. (2006). Bat flies: obligate ectoparasites of bats *Micromammals and macroparasites* (pp. 179-194): Springer.
- Dietz, C., Helvesen, O. von & Nill, D. (2009). L'encyclopédie des chauves-souris d'Europe et d'Afrique du Nord: Biologie, caractéristiques, protection. *Delachaux et Niestlé*.
- Dizney, L., & Dearing, M. D. (2013). The role of behavioural heterogeneity on infection patterns: implications for pathogen transmission. *Animal behaviour*, 86(5), 911-916.
- Donaldson, E. F., Haskew, A. N., Gates, J. E., Huynh, J., Moore, C. J., & Frieman, M. B. (2010). Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *Journal of virology*, 84(24), 13004-13018.
- Dwyer, P. (1963). Seasonal changes in Pelage of *Miniopterus schreibersi blepotis* (Chiroptera) in north-eastern NSW. *Australian Journal of Zoology*, 11(3), 290-300.
- Ellison, L. E., O'shea, T. J., Neubaum, D. J., Neubaum, M. A., Pearce, R. D., & Bowen, R. A. (2007). A comparison of conventional capture versus PIT reader techniques for estimating survival and capture probabilities of big brown bats (*Eptesicus fuscus*). *Acta Chiropterologica*, 9(1), 149-160.

- Ellison, L. E., O'Shea, T. J., Wimsatt, J., Pearce, R. D., Neubaum, D. J., Neubaum, M. A., & Bowen, R. A. (2006). Sampling blood from big brown bats (*Eptesicus fuscus*) in the field with and without anesthesia: impacts on survival. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(4), 849-852.
- Ethier, D. M., Kyle, C. J., Kyser, T. K., & Nocera, J. J. (2010). Variability in the growth patterns of the cornified claw sheath among vertebrates: implications for using biogeochemistry to study animal movement. *Canadian Journal of Zoology*, 88(11), 1043-1051.
- Farcy O, F., Touzalin. (2012). Etude de la dynamique des populations de grand murin (*Myotis myotis*) en Bretagne et Pays-de-la-Loire, Bilan 2011-2013.
- Faure, P. A., Re, D. E., & Clare, E. L. (2009). Wound healing in the flight membranes of big brown bats. *Journal of Mammalogy*, 90(5), 1148-1156.
- Fleming, T. H., Eby, P., Kunz, T., & Fenton, M. (2003). Ecology of bat migration. *Bat ecology*, 156-208.
- Fraser, E., Longstaffe, F., & Fenton, M. (2013). Moulting matters: the importance of understanding moulting cycles in bats when using fur for endogenous marker analysis. *Canadian Journal of Zoology*, 91(8), 533-544.
- Gibbons, W. J., & Andrews, K. M. (2004). PIT tagging: simple technology at its best. *Bioscience*, 54(5), 447-454.
- Giorgi, M. S., Arlettaz, R., Guillaume, F., Nusslé, S., Ossola, C., Vogel, P., & Christe, P. (2004). Causal mechanisms underlying host specificity in bat ectoparasites. *Oecologia*, 138(4), 648-654.
- Glover, A. M., & Altringham, J. D. (2008). Cave selection and use by swarming bat species. *Biological Conservation*, 141, 1493-1504. doi: 10.1016/j.biocon.2008.03.012
- Godineau, F., & Pain, D. (2007). Plan de restauration des chiroptères en France métropolitaine, 2008-2012. Société Française pour l' Étude et la Protection des Mammifères/Ministère de l' Écologie, du Développement et de l' Aménagement Durables. Plan National d'actions en faveur des chiroptères. Plan actions chiropteres website. *Ministère de l' Écologie, du Développement et de l' Aménagement Durables*, 79.
- Gustafson, A., & Damassa, D. (1985). Repetitive blood sampling from small peripheral veins in bats. *Journal of Mammalogy*, 173-177.
- Hellard, E., Fouchet, D., Santin-Janin, H., Tarin, B., Badol, V., Coupier, C., . . . Pontier, D. (2011). When cats' ways of life interact with their viruses: A study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*). *Preventive Veterinary Medicine*, 101(3-4), 250-264. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.020>
- Hobson, K. A., & Wassenaar, L. I. (2008). *Tracking animal migration with stable isotopes* (Vol. 2): Academic Press.

- Hutterer, R. (2005). *Bat migrations in Europe : a review of banding data and literature / Rainer Hutterer ... [et al.]*: Bonn : Federal Agency for Nature Conservation, 2005.
- Ilyin, V. Y. (1990). *The seasonal shedding of Pipistrellus nathusii and Nyctalus noctula*. Paper presented at the Proceedings of the Fifth All-Union Bat Conference, Penza, Russia. Edited by V. Yu Ilyin, PP Strelkov, and VA Rodionov. Penza State Educational Institute, Penza, Russia.
- Kerth, G., Ebert, C., & Schmidtke, C. (2006). Group decision making in fission–fusion societies: evidence from two-field experiments in Bechstein's bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1602), 2785-2790. doi: 10.1098/rspb.2006.3647
- Kerth, G., Klaus, W., & Barbara, K. (2001). Day Roost Selection in Female Bechstein's Bats (*Myotis bechsteinii*): A Field Experiment to Determine the Influence of Roost Temperature, 1.
- Kerth, G., & Reckardt, K. (2003). Information transfer about roosts in female Bechstein's bats: an experimental field study. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 270(1514), 511-515.
- Leroy EM, K. B., Pourrut X et al. . (2005). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438 :575-6.
- Lewis, J. C. M. (2004). Field Use of Isoflurane and Air Anesthetic Equipment in Wildlife, 303.
- Li W, S. Z., Yu M, Ren W et al. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. . *Science* 310 :676-9.
- Lonrenco, S., & Mestre Palmeirim, J. (2008). Which factors regulate the reproduction of ectoparasites of temperate-zone cave-dwelling bats? (English). *Parasitology research (1987)*, 104(1), 127-134.
- McLaughlin, A. B., Epstein, J. H., Prakash, V., Smith, C. S., Daszak, P., Field, H. E., & Cunningham, A. A. (2007). Plasma biochemistry and hematologic values for wild-caught flying foxes (*Pteropus giganteus*) in India. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(3), 446-452.
- Médaille, C., Briend-Marchal, A., & Braun, J.-P. (2005). Prélèvement sanguin. *EMC-Vétérinaire*, 2(1), 1-13.
- MEDDE. (2012). Indicateurs & Indices - SYNTHÈSE SUR LA BIODIVERSITÉ
Les populations de chauve souris en France métropolitaine.
- Milner-Gulland, E., Fryxell, J. M., & Sinclair, A. R. E. (2011). *Animal migration: a synthesis*: Oxford University Press Oxford.
- Mo, G., Gili, C., & Ferrando, P. (2000). Do photoperiod and temperature influence the molt cycle of *Phoca vitulina* in captivity? *Marine mammal science*, 16(3), 570-577.
- Moussy, C., Hosken, D. J., Mathews, F., Smith, G. C., Aegerter, J. N., & Bearhop, S. (2013). Migration and dispersal patterns of bats and their influence on genetic structure. *Mammal Review*, 43(3), 183-195. doi: 10.1111/j.1365-2907.2012.00218.x

- Negredo, A., Palacios, G., Vázquez-Morón, S., González, F. I., Dopazo, H., Molero, F., . . . Tenorio, A. (2011). Discovery of an Ebolavirus-Like Filovirus in Europe. *PLoS Pathogens*, 7(10), 1-8. doi: 10.1371/journal.ppat.1002304
- Neubaum, D. J., Neubaum, M. A., Ellison, L. E., & O'Shea, T. J. (2005). Survival and condition of big brown bats (*Eptesicus fuscus*) after radiotagging. *Journal of Mammalogy*, 86(1), 95-98.
- Neuweiler, G. (2000). *The biology of bats*: Oxford University Press.
- Ockenga J, T. H., Trautwein C, Stoll M, Manns MP, Schmidt RE. (1997). Hepatitis B and C in HIV-infected patients. Prevalence and prognostic value. *J Hepatol* 27(1):18-24.
- Olfert, E. D., Cross, B. M., & McWilliam, A. A. (1993). *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation* (Vol. 1): Conseil canadien de protection des animaux.
- Ott Joslin, J. (2009). Topics in medicine and surgery: Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18, 117-139. doi: 10.1053/j.jepm.2009.04.002
- Papadatou, E., Butlin, R. K., & Altringham, J. D. (2008). SEASONAL ROOSTING HABITS AND POPULATION STRUCTURE OF THE LONG-FINGERED BAT MYOTIS CAPACCINII IN GREECE. *Journal of Mammalogy*, 89(2), 503-512.
- Papadatou, E., Butlin, R. K., Pradel, R., & Altringham, J. D. (2009). Sex-specific roost movements and population dynamics of the vulnerable long-fingered bat, *Myotis capaccinii*. *Biological Conservation*, 142(2), 280-289. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2008.10.023>
- Parsons, K., Jones, G., & Greenaway, F. (2003). Swarming activity of temperate zone microchiropteran bats: effects of season, time of night and weather conditions. *Journal of zoology*, 261(03), 257-264.
- Poissant, J. A., & Broders, H. G. (2008). Ectoparasite prevalence in *Myotis lucifugus* and *M. septentrionalis* (Chiroptera: Vespertilionidae) during fall migration at Hayes Cave, Nova Scotia. *Northeastern Naturalist*, 15(4), 515-522.
- Popa-Lisseanu, A. G., Bontadina, F., Mora, O., & Ibanez, C. (2008). Highly structured fission-fusion societies in an aerial-hawking, carnivorous bat (English). *Animal behaviour*, 75(2), 471-482.
- Racey, P. A., Swift, S. M., & MacKie, I. (2011). Recommended methods for bleeding small bats... Comment on Smith et al. 2009. *Acta Chiropterologica*, 13(1), 223-225.
- Reckardt, K., & Kerth, G. (2007). Roost Selection and Roost Switching of Female Bechstein's Bats (*Myotis bechsteinii*) as a Strategy of Parasite Avoidance, 581.
- Reckardt, K., & Kerth, G. (2009). Does the mode of transmission between hosts affect the host choice strategies of parasites? Implications from a field study on bat fly and wing mite infestation of Bechstein's bats. *Oikos*, 118(2), 183-190.

- Rigby, E. A., J ; Brash, M ; Altringham, JD. (2012). Impact of PIT tagging on recapture rates, body condition and reproductive success of wild Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *The Veterinary record*, 170(4), 101-101.
- Rivers, N. M., Butlin, R. K., & Altringham, J. D. (2006). Autumn swarming behaviour of Natterer's bats in the UK: population size, catchment area and dispersal. *Biological Conservation*, 127(2), 215-226.
- Rodrigues, L., & Palmeirim, J. M. (2008). Migratory behaviour of the Schreiber's bat: when, where and why do cave bats migrate in a Mediterranean region. *Journal of zoology*.
- Roué S.Y., N. m. M. (2002). Mortalité exceptionnelle du Minioptère de Schreibers en France lors de l'année 2002. *Bilan national. S.F.E.P.M., Paris, France*.
- Russ, J., Hutson, A., Montgomery, W., Racey, P., & Speakman, J. (2001). The status of Nathusius' pipistrelle (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839) in the British Isles. *Journal of zoology*, 254(01), 91-100.
- Ruys T, B. Y., (coords.). (2014). Atlas des mammifères sauvages d'Aquitaine - tome 4 - Les Chiroptères. *Cistude Nature & LPO Aquitaine, Edition C. Nature, 256 pp*.
- Simons, R. R. L., Gale, P., Horigan, V., Snary, E. L., & Breed, A. C. (2014). Potential for Introduction of Bat-Borne Zoonotic Viruses into the EU: A Review. *Viruses*, 6(5), 2084-2121. doi: 10.3390/v6052084
- Smith, C. S., De Jong, C. E., & Field, H. E. (2010). Sampling small quantities of blood from microbats. *Acta Chiropterologica*, 12(1), 255-258.
- Speakman, J., Irwin, N., Tallach, N., & Stone, R. (1999). Effect of roost size on the emergence behaviour of pipistrelle bats. *Animal behaviour*, 58(4), 787-795.
- Speakman, J. R., Thomas, D. W., Kunz, T., & Fenton, M. (2003). Physiological ecology and energetics of bats. *Bat ecology*, 430-490.
- Teeling EC, S. M., Madsen O, Bates P, O'Brien SJ, Murphy WJ (2005). A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307: 580–584.
- van Schaik, J., Kerth, G., Bruyndonckx, N., & Christe, P. (2014). The effect of host social system on parasite population genetic structure: comparative population genetics of two ectoparasitic mites and their bat hosts. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 1-30. doi: 10.1186/1471-2148-14-18
- Wibbelt, G., Kurth, A., Hellmann, D., Weishaar, M., Barlow, A., Veith, M., . . . Blehert, D. S. (2010). White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bats, Europe. *Emerging Infectious Diseases*(8), 1237.
- Wilkinson, G. S. (1992). Information transfer at evening bat colonies. *Animal behaviour*, 44, 501-518.

- Willis, C. K. R., & Brigham, R. M. (2004). Roost switching, roost sharing and social cohesion: forest-dwelling big brown bats, *Eptesicus fuscus*, conform to the fission–fusion model. *Animal behaviour*, 68, 495-505. doi: 10.1016/j.anbehav.2003.08.028
- Wimsatt, J., O'Shea, T. J., Ellison, L. E., Pearce, R. D., & Price, V. R. (2005). Anesthesia and blood sampling of wild big brown bats (*Eptesicus fuscus*) with an assessment of impacts on survival. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(1), 87-95.
- Wong S, L. S., Woo P, Yuen KY. (2007). Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev Med Virol*. 17: 67-91.
- Wunder, M. B. (2012). Determining geographic patterns of migration and dispersal using stable isotopes in keratins. *Journal of Mammalogy*, 93(2), 360-367. doi: 10.1644/11-MAMM-S-182.1
- Young, P. L., Halpin, K., Selleck, P. W., Field, H., Gravel, J. L., Kelly, M. A., & MacKenzie, J. S. (1996). Serologic evidence for the presence in *Pteropus* bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerging Infectious Diseases*, 2(3), 239.
- Zahn, A., & Rupp, D. (2004). Ectoparasite load in European vespertilionid bats. *J Zool*, 262, 383 - 391.
- Zeale, M. R. K., Davidson-Watts, I., & Jones, G. (2012). Home range use and habitat selection by barbastelle bats (*Barbastella barbastellus*): implications for conservation. *Journal of Mammalogy*, 93(4), 1110-1118. doi: 10.1644/11-MAMM-A-366.1

